

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Osteointegração de Blendas de PLDLA/PCL.
Estudo *in vitro* e *in vivo*.

Autor: Marcelo Roberto Pinto
Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Osteointegração de Blendas de PLDLA/PCL. Estudo in vitro e in vivo.

Autor: Marcelo Roberto Pinto

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

Curso: Engenharia Mecânica

Área de Concentração: Engenharia de Materiais e Processos de Fabricação

Dissertação de mestrado acadêmico apresentado à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Campinas, 2007
S.P. – Brasil

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

P658o	<p>Pinto, Marcelo Roberto</p> <p>Osteointegração de blendas de PLDLA/PCL <i>estudo in vitro e in vivo</i> / Marcelo Roberto Pinto. --Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.</p> <p>1. Histologia. 2. Polímeros na medicina. I. Duek, Eliana Aparecida de Rezende. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.</p>
-------	--

Título em Inglês: Osteointegration of PLDLA/PCL blends. In vitro and in vivo study

Palavras-chave em Inglês: Histology, Polymers in medicine

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Maria do Carmo
Alberto-Rincon

Data da defesa: 10/07/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADEMICO

**Osteointegração de Blendas de PLDLA/PCL.
Estudo *in vitro* e *in vivo*.**

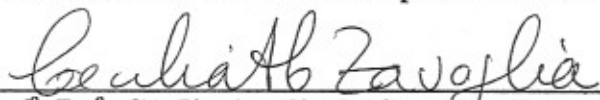
Autor: **Marcelo Roberto Pinto**

Orientador: **Eliana Aparecida de Rezende Duek**

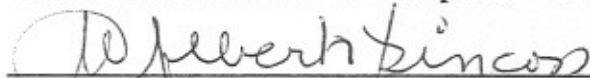
A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Prof^a. Dr^a. Eliana Aparecida de Rezende Duek, Presidente
Universidade Estadual de Campinas – DEMA/FEM



Prof^a. Dr^a. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Universidade Estadual de Campinas – DEMA/FEM



Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alberto-Rincon
Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – CCMB.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus pela iluminação e proteção em todos os momentos....

Aos meus amados pais Jurandir e Janete que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida, e a quem eu devo tudo.

A Aline, André, Bruno, Beatriz e Leonardo pelo apoio, carinho e compreensão.

A querida orientadora, amiga e parceira de longa data, Profa. Dra. Eliana Duek, que é sempre fonte inspiradora de todos ao seu redor.

A Profa. Dra. Débora Coraça pela Co-orientação, amizade, ajuda e suporte.

A todos os amigos e companheiros de laboratório, em especial a Carolina Lucchesi, Kátia Silva, Grazielle, Lucas, Márcia, Samuel, Daniel, Larissa e Antonella.

Aos meus amigos Kátia Lopes, Vanderley, Eleandro, Selma, Rita de Cássia, Danielle, Carolina Gava, Luciane e Andréia que acompanharam todo meu trajeto e sempre torceram por mim.

Aos professores, funcionários e da Faculdade de Engenharia Mecânica, Departamento de Materiais / UNICAMP.

...Obrigado, Marcelo !

“Aquele que procura pérolas deve mergulhar fundo”.
(John Dryder)

PUBLICAÇÕES

Periódicos

PINTO, M. R. ; DUEK, E. A, R . In vitro study of poly(l-lactide-co-d,l-lactide)/ poly(caprolactone) blends. Polymer, *in preparation*

SILVA, R, J, C ; PINTO, M. R. ; FERREIRA, B, M, P ; BARBO, M, L, P ; DUEK, E. A, R . Effect of the Nitrogen Plasma tretment on the surface of PHBV membranes in the Polymer/Tissue interaction, after implant in rat. Polímeros. *in preparation*.

PINTO, M. R. ; SAKATA, M, M ; FERREIRA, B, M, P ; DUEK, E. A, R. Evaluation of Polymer/Tissue interaction using PHBV membranes treated with oxygen plasma. *Artificial Organs. In press.*

PINTO, M. R.; MARIANO, E. C ; DUEK, E. A, R . Blendas de PLLA/PCL como próteses de meniscos. Polímeros. *In preparation*

PINTO, M. R.; ALBERTO-RINCON, M, C ; LUCCHESI, C ; DUEK, E. A, R . In vivo interaction of poly(L-lactide-co-D,L-lactide)/poly(ethilene oxide) blends containing plasticizer. Journal od Materials Science. *In preparation*

Pinto, Marcelo Roberto, *Osteointegração de Blendas de PLDLA/PCL. Estudo in vitro e in vivo*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 92 p. Dissertação de Mestrado.

Os polímeros bioreabsorvíveis apresentam grande potencial de uso biomédico, pois são geralmente, fáceis de processar e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos, como é o caso do poli(L-ácido láctico) amplamente estudado nas últimas décadas. Uma maneira de modificar as propriedades de um homopolímero para aplicações ortopédicas é a obtenção de blendas, visando melhorar suas propriedades comparando-se aos polímeros puros. Contudo, esse trabalho tem por objetivo: 1) avaliar a degradação *in vitro* das blendas de PLDLA/PCL, nas proporções 100/0, 90/10, 80/20 e 70/30 e caracterizá-las através de análises de MEV, DSC, GPC e ensaio mecânico antes e após degradação das amostras em tampão fosfato. 2) realizar o estudo *in vivo*. Os resultados *in vitro*, revelaram que até o período de 180 dias, todos os materiais estudados (PLDLA/PCL) nas composições 100/0, 90/10, 80/20 e 70/30, a partir das análises de DSC, MEV e ensaio mecânico apresentaram discretos sinais de degradação, e após o período de 180 dias todos os materiais apresentavam-se degradados. Das análises realizadas, o GPC foi a mais sensível, ou seja, embora se verifique perda de massa molar, as propriedades térmicas são estáveis, o mesmo pode ser observado nas análises de DSC. As propriedades mecânicas das blendas não apresentaram alterações significativas até 180 dias de degradação, revelando que a blenda torna-se mais elástica e menos frágil com a adição de PCL. As análises de MEV revelaram uma discreta degradação da blenda 70/30 em 180 dias e completa degradação de todas as amostras após 220 dias. A partir do estudo *in vitro*, escolheu-se as blendas (PLDLA/PCL) 100/0 e 70/30 para o estudo *in vivo*. Os resultados revelaram que o grau de organização tecidual se estabeleceu em função do período de implante. Até o período de 180 dias não houve diferença *in vivo* relevante entre os pinos de PLDLA puro e da blenda PLDLA/PCL (70/30). Nesse experimento os cortes histológicos revelaram ausência de células inflamatórias e reações de corpo estranho na interface óssea em períodos mais longos de implantes. Foi predominante a presença de células ósteo-progenitoras povoando a interface por tecido mineralizado ao redor dos polímeros.

Palavras Chave: Blendas, PLDLA, PCL, Osteointegração.

Pinto, Marcelo Roberto, *Osteointegration of PLDLA/PCL blends. In vitro and in vivo study*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 92 p. Dissertação de Mestrado

Bioreabsorbable polymers present great potential in biomedical applications, because they are usually, easy to process and they present a similar biological mechanical characteristics, as it is the case of poly(L- lactic acid) very studied in the last decades. A way to modify the properties of a homopolymer for orthopedic applications is obtention of blends, aiming to improve their properties compared to the pure polymers. The aim of this study was: 1) to evaluate the *in vitro* degradation of PLDLA/PCL blends, in the 100/0, 90/10, 80/20 and 70/30 compositions and to characterize them by SEM, DSC, GPC analyses and mechanical properties before and after degradation process phosphate buffer. 2) to accomplish the *in vivo study*. The *in vitro* results by DSC, SEM and mechanical properties until 180 days, for all the blends, presented a discreet degradation signals, and after this period, all the materials presented degraded. GPC analyses, was the most sensitive compared with others, in other words, although loss of molar mass was verified, the thermal properties are stable. The same behavior was seen in DSC analyses. The mechanical properties of blends did not present significant modifications up to 180 days of degradation, showing that with the largest addition of PCL, the blends became more elastic and less fragile. SEM analyses showed a discreet degradation of 70/30 blends in 180 days and complete degradation process for all the blends after 220 days. Based in *in vitro* study the 100/0 and 70/30 blends were chosen to be implanted. The results revealed that the degree of tissue organization was function of implanted time. Until the 180 days of implantation there was not differentiates relevant *in vivo* between pure PLDLA and the 70/30 blends. In that experiment the histological cuts revealed absence of inflammatory cells and foreign body cells reaction in the bone interface in longer periods of implants. It was predominant the ósteo-progenitors cells populating the interface, surrounded by mineralized tissue around of polymers.

Key-words: Blends, PLDLA, PCL, Osteointegration.

Índice

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiv
Nomenclaturas	xv
 Capítulo 1- Introdução	 01
 Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	 03
2.1. Biomateriais	03
2.2. Polímeros biorreabsorvíveis	04
2.3. Blendas Poliméricas	09
2.4. Polímeros biorreabsorvíveis em aplicações ortopédicas	11
 Capítulo 3- Materiais e Métodos	 18
3.1. Obtenção das Blendas	18
3.2. Degradação in vitro em tampão fosfato	19
3.3. Caracterização das amostras	20
3.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	20
3.3.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	20
3.3.3. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	21
3.3.4. Ensaio Mecânico de Flexão.	21
3.4. Implante dos Pinos	22
3.5. Processamento dos Materiais	24

3.5.1. <i>Microscopia de Luz</i>	24
3.5.2. <i>Inclusão em Parafina</i>	25
Capítulo 4 – Resultados e discussão dos Resultados in vitro	26
4.1. Estudo da degradação in vitro	30
4.2. Ensaio Mecânico de Flexão	30
4.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	35
4.4. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	42
4.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	46
Capítulo 5 – Resultados e discussão dos Estudos in vivo	58
5.1. Análise Morfológica	58
5.2. Discussão	75
Capítulo 6 – Conclusões Finais	80
Capítulo 7- Referencias Bibliográficas	82

Lista de figuras

Figura 2.1: Esquema simplificado da degradação do poli(ácido láctico)	05
Figura 2.2: Diéster cíclico do ácido láctico e seus possíveis estereoisômeros	08
Figura 3.1: Preparo de suporte de polímeros biorreabsorvíveis pela técnica da fusão	19
Figura 3.2: Desenho ilustrativo do estudo <i>in vitro</i> da degradação dos pinos	19
Figura 3.3: Ilustração do ensaio de flexão pelo método de 3 pontas	22
Figura 3.4: Procedimento cirúrgico para implante dos pinos em tíbia dos animais	23
Figura 4.1: Acompanhamento visual do processo de degradação (em dias) dos pinos de PLDLA/PCL (100/0)	27
Figura 4.2: Acompanhamento visual do processo de degradação (em dias) dos pinos de PLDLA/PCL (90/10)	28
Figura 4.3: Acompanhamento visual do processo de degradação (em dias) dos pinos de PLDLA/PCL (80/20)	28

Figura 4.4: Acompanhamento visual do processo de degradação (em dias) dos pinos de PLDLA/PCL (70/30)	29
Figura 4.5 – Módulo de Young (E) das blendas de PLDLA/PCL 100/0, 90/10, 80/20 e 70/30 em função do tempo de degradação	30
Figura 4.6: Microscopia Eletrônica de Varredura da Blenda de PLDLA/PCL antes da degradação em diferentes composições. A e B (100/0), C e D (90/10), E e F (80/20), G e H (70/30)	38
Figura 4.7: Microscopia Eletrônica de Varredura da Blenda de PLDLA/PCL após 120 dias de degradação em diferentes composições. A e B (100/0), C e D (90/10), E e F (80/20) , G e H (70/30)	39
Figura 4.8: Microscopia Eletrônica de Varredura da Blenda de PLDLA/PCL após 180 dias de degradação em diferentes composições. A e B (100/0), C e D (90/10), E e F (80/20) , G e H (70/30)	40
Figura 4.9: Fotomicrografia Eletrônica de Varredura de Blenda de PLDLA/PCL após 220 dias de degradação em diferentes composições. A e B (100/0), C e D (90/10), E e F (80/20), G e H (70/30).	41
Figura 4.9.1: Massa Molar das blendas PLDLA/PCL (100/0, 90/10, 80/20 e 70/30) durante o período de degradação	43
Figura 4.9.2: Curva de DSC da poli(caprolactona) pura	47
Figura 4.9.3: Curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL 100/0 após 0, 7, 30, 60, 120, 180 e 220 dias de degradação	48
Figura 4.9.4: Curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL 90/10 após 0, 7, 30, 60, 120, 180 e 220 dias de degradação.	49

Figura 4.9.5 : Curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL 80/20 após 0, 7, 30, 60, 120, 180 e 220 dias de de degradação.	50
Figura 4.9.6: Curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL 70/30 após 0, 7, 30, 60, 120, 180 e 220 dias de degradação	51
Figura 4.9.7: Curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL 100/0, 90/10, 80/20 e 70/30 após 220 dias de degradação	52
Figura 4.9.8: Curvas de DSC para as blendas PLDLA 70/30 antes da degradação	56
Figura 5.1: Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA/PCL puro após 7 dias de implante	64
Figura 5.2: Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA/PCL puro após 15 dias de implante	66
Figura 5.3: Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA/PCL puro após 30 dias de implante	68
Figura 5.4: Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA/PCL puro após 80 dias de implante	70
Figura 5.5: Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA/PCL puro após 120 dias de implante	72
Figura 5.6: Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA/PCL puro após 180 dias de implante	74

Lista de Tabelas

Tabela.2.1 : Estruturas dos principais poliésteres alifáticos	06
--	----

Tabela 4.1: Módulo de Young (E) e Força Máxima no ensaio mecânico de flexão de amostras densas e porosas de PLDLA/PCL em função do tempo de degradação em tampão fosfato	34
---	----

Tabela 4.2: Valores da cromatografia de permeação em gel (GPC) das blendas de PLDLA/PCL em função do tempo de degradação em tampão fosfato.	45
--	----

Tabela 4.3: Dados de temperatura de transição vítrea, T_g (°C) do PLDLA nas blendas de PLDLA/PCL em função do tempo de degradação, a partir do segundo aquecimento	53
--	----

Tabela 4.4: Dados de temperatura de fusão (T_f) da PCL na blendas de PLDLA/PCL a partir do fluxo de calor não reversível	55
---	----

Nomenclaturas

PLLA: poli(L-ácido láctico)

PLDLA: poli(L-co-D,L, ácido láctico)

PCL: poli(ϵ -caprolactona)

PHBV: poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

PLA: poli(ácido láctico)

PGA: poli(ácido glicólico)

PPD: poli(*p*-dioxanona)

In vitro: Estudo da degradação de materiais em laboratório em tampão fosfato.

In vivo: Estudo da degradação de materiais implantados em animais.

Blenda: Mistura física de polímeros ou co-polímeros.

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

DSC: Calorimetria Diferencial de Varredura

GPC: Cromatografia de Permeação em Gel

pH: Potencial hidrogeniônico (índice que indica o grau de acidez, neutralidade ou alcalinidade de um meio qualquer).

MPa: Mega pascal, unidade de pressão.

S.D: Desvio Padrão

M_w: Massa molar média em peso

M_n: Massa molar média em número

I.P: Índice de Polidispersibilidade

T_g: Temperatura de Transição Vítrea

T_f: Temperatura de Fusão

H.E: Coloração histológica, Hematoxilina e Eosina.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

É cada vez maior a necessidade do desenvolvimento de novos materiais para atender às necessidades da área médica e odontológica.

Tornou-se freqüente o uso de dispositivos implantáveis na área da saúde para restaurar funções perdidas de uma determinada área do corpo devido a doenças, acidentes ou desgastes naturais. Nesse sentido, a área de biomateriais tem recebido grande destaque.

Biomateriais são definidos como uma substâncias ou combinações de substâncias, naturais ou sintéticas que podem ser utilizadas por um período de tempo para melhorar ou substituir, parcial ou inteiramente tecidos e órgãos.

O aumento da expectativa da qualidade de vida junto com os avanços da medicina atual tem possibilitado o desenvolvimento de novos biomateriais a serem utilizados como dispositivos temporários ou permanentes para implantes no corpo humano.

A escassez de órgãos e tecidos para implantes motivou o estudo de matrizes poliméricas que induzissem a regeneração de tecidos danificados por doenças, traumas ou membros perdidos, sendo os polímeros bioreabsorvíveis os mais estudados para essas finalidades.

A questão a se fazer é como o profissional da saúde pode se beneficiar pelo uso de um material que se degrada ao longo do tempo? Existem variadas razões, mas a mais importante se enquadra na simples evidência física na qual um simples dispositivo seja ele um fio de sutura ou dispositivo para fixação óssea, cumpra com a função de restabelecimento pleno das condições

teciduais de normalidade, enquanto se degrada e gradativamente transfere as funções de hemostasia para o tecido em recuperação, sem alteração no ciclo metabólico.

Dependendo dos componentes do polímero esses materiais podem ser modulados para prover rigidez inicial suficiente para permitir a consolidação óssea, suportar determinada resistência mecânica por um período de tempo e em alguns casos começar a degradação. A otimização das propriedades desses materiais, tais como permeabilidade à taxa de biodegradação e as propriedades mecânicas, tem sido geralmente alcançadas através da copolimerização ou blends.

Nesse sentido, o uso de polímeros bioreabsorvíveis como o PLLA, PLDLA, PCL, PHBV e outros vem sendo investigados em estudos biomédicos na tentativa de regenerar tecidos lesionados, pois apresentam excelentes propriedades mecânicas e degradam no organismo, fazendo com que o organismo tenda a se reestruturar e preencher o local onde se encontrava o material polimérico.

O Poli (ácido láctico) existe em duas formas químicas específicas: Poli (L-ácido láctico), que tem como característica ser altamente cristalino e Poli (D,L ácido láctico), que é completamente amorfo. Essas duas formas (L ou DL) são passíveis de combinação, resultando na formação de um copolímero com propriedades diferentes daquelas exibidas por cada um desses homopolímeros isolados. Trata-se do copolímero Poli (L-co-D,L ácido láctico), PLDLA.

Outro polímero bioreabsorvível estudado é o PCL, por apresentar características como, por exemplo, ser semi cristalino, está sendo utilizado no contexto de sistemas de liberação de drogas e em outros usos na área médica, como dispositivo para fixação cirúrgica.

Contudo, o objetivo desse trabalho é a preparação e caracterização de pinos poliméricos bioreabsorvíveis a partir de blends de PLDLA/PCL para o estudos de degradação *in vitro* destas blends e *in vivo* através de implantes desses pinos em tíbias de ratos para que futuramente possa ser utilizado na área médica.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomateriais

Os biomateriais fazem parte de uma área de pesquisa relativamente nova que surgiu com o avanço científico e tecnológico de novos materiais e da adaptação dos já existentes para o uso médico/odontológico. Esta área envolve trabalho interdisciplinar de pesquisadores de várias áreas afins, como médicos, dentistas, biólogos, engenheiros, químicos e físicos.

A definição de biomateriais é um pouco complexa e vem sofrendo mudanças em função do avanço das pesquisas na área. A definição adotada em 1982 na NIH Consensus Development Conference é a de que *biomaterial* é qualquer substância ou combinação de substâncias, que não drogas, de origem naturais ou sintéticas, que pode ser usado por qualquer período de tempo, como um todo ou parte do sistema, para aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. A definição adotada na Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, mais simplificada, é a de que *biomaterial* é todo material não vivo usado em dispositivo médico (ou biomédico), objetivando interação com o sistema biológico (WILLIAMS, 1987).

Para que um biomaterial possa ser implantado no corpo humano ele deve satisfazer uma série de exigências. Além de biocompatível e biofuncional, deve ser atóxico, fácil de esterilizar e apresentar propriedades mecânicas adequadas, dependendo do propósito da aplicação (VERT, 1992). De um modo geral um material biocompatível não deve provocar reação inflamatória crônica ou aguda do tecido e não deve apresentar diferenças significativas entre o material implantado e o material circunvizinho. Entretanto o conceito de biocompatibilidade também foi

evoluindo com os anos e a definição mais aceita é de que *biocompatibilidade* é a habilidade de um material para induzir no hospedeiro uma resposta adequada a uma aplicação específica (WILLIAMS, 1987). A biocompatibilidade inclui também outros fenômenos biológicos, tais como, a resposta imunológica, carcinogenicidade e trombogenicidade (VERT, 1992).

Outro termo para definir um biomaterial é a *biofuncionalidade*, que é a capacidade do material exercer a função proposta, como por exemplo, a de reparar um tecido ou de fixar uma fratura, ou seja, a biofuncionalidade depende das propriedades físicas, mecânicas e biológicas (VERT, 1992). Um biomaterial pode ser biocompatível e não ser funcional ao mesmo tempo.

Uma constante preocupação no campo cirúrgico e reparador relacionam-se ao restabelecimento de porções do corpo humano lesionadas, principalmente quando é levado em consideração o sistema esquelético.

Guiados por estudos clínicos e experimentais efetuados ao decorrer dos tempos, pesquisadores tentam desenvolver novos materiais, assim como técnicas mais apropriadas para o restabelecimento de porções ósseas lesadas por ocasião de algum trauma ou doenças diversas, visando assim à recomposição mais próxima possível da ideal para anatomia. As recentes pesquisas têm objetivado elaborar materiais com propriedades semelhantes ao tecido que deverá ser recomposto (JOSHUA, *et al*, 2007)

2.2. Polímeros Biorreabsorvíveis.

Os poli (α -hidróxi- ácidos) constituem uma classe de poliésteres representados pela fórmula geral $-(O-CHR-CO)-$ (VERT, 1992). Estes polímeros possuem grande potencial em aplicações biomédicas, pois são biocompatíveis e bioreabsorvíveis.

O processo de biodegradação e bioreabsorção dos poli(α -hidroxi ácidos) é descrito na literatura como sendo uma sucessão de eventos. Exposto aos fluidos aquosos do corpo, inicialmente o material sofre hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de

degradação dá-se através de hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos (ZANG, *et al*, 2007).

O mecanismo da degradação *in vitro* dos polímeros bioreabsorvíveis tem sido avaliados nos últimos anos e demonstram ser um processo heterogêneo na extensão do material. Os principais produtos da hidrólise das ligações ésteres são CO_2 e H_2O . O processo é homogêneo inicialmente, gerando oligômeros solúveis em água em toda a extensão do material. Os produtos presentes na superfície da matriz são difundidos para o meio, entretanto, a baixa taxa de difusão dos produtos da reação no interior do material gera um acúmulo de ácidos, fazendo com que as estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada no centro (KELLOMÄKI, *et al*, 2004). O aumento da taxa de degradação é devido a auto catálise pela presença dos grupos carboxílicos terminais.

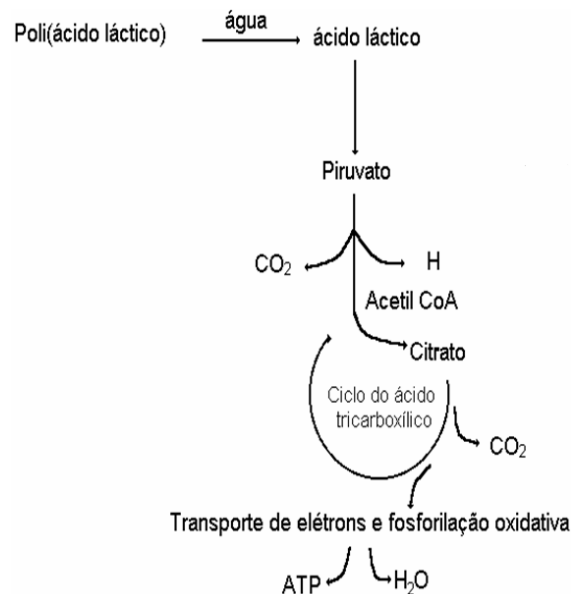


Figura 2.1: Esquema simplificado da degradação do poli(ácido láctico) (BÖSTMAN, 1991).

Alguns exemplos de polímeros bioreabsorvíveis tais como, o poli(ácido láctico) (PLA), o poli (ácido glicólico) (PGA), poli (hidróxibutirato) (PHB), a poli(caprolactona) (PCL) e a poli(para-dioxanona).

Tabela.2.1 : Estruturas dos principais poliésteres alifáticos (LI & VERT, 1995).

<i>Polímeros</i>	<i>Sigla</i>	<i>Estrutura</i>
Poli(ácido glicólico)	PGA	$-(\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-)_n$
Poli(ácido láctico)	PLA	$-(\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-)_n$
<i>Poli(ϵ-caprolactona)</i>	PCL	$-(\text{O}-(\text{CH}_2)_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-)_n$
<i>Poli(3-hidroxibutirato)</i>	<i>P(3HB)</i>	$-(\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-)_n$
Poli(3-hidroxivalerato)	P(3-HV)	$-(\text{O}-\underset{\text{CH}_2\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-)_n$
Poli(<i>p</i> -dioxanona)	PPD	$-(\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-)_n$

Materiais poliméricos bioreabsorvíveis têm sido utilizados com bom sucesso clínico na fixação interna e estabilização de fraturas. O uso de fixadores reabsorvíveis elimina a necessidade de uma segunda cirurgia após a recuperação do osso. A prótese polimérica deve ter as seguintes propriedades: estrutura química e física apropriada para satisfazer o tempo da vida útil desejável no organismo; ausência de substâncias contaminantes e possibilidade de ser esterilizada. Além disso, os polímeros não devem induzir a formação de tumores, trombose ou inflamação nos tecidos vizinhos. Todo este requisito reduz em muito o número de polímeros que são candidatos potenciais pra aplicações biomédicas (BLUMM, 1995).

O poli(ácido-lático) possui algumas vantagens potenciais como sua alta resistência, bom comportamento termoplástico, biocompatibilidade e disponibilidade de fonte renovável. Na presença de água o poli(l-ácido-lático) (PLLA), se degrada em ácido-lático e é, portanto adequado para o uso cirúrgico como material reabsorvível e atóxico (BLUMM, 1995).

Os polímeros bioreabsorvíveis apresentam grande potencial de uso, pois são geralmente, fáceis de processar e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos, como é o caso do poli(L-ácido lático) amplamente estudado nas últimas décadas.

A primeira síntese do PLLA foi realizada em 1932, por CAROTHERS, *et al*, que obteve esse material com baixa massa molar, e com propriedades mecânicas inferiores às exigidas em determinadas aplicações (CAROTHERS, *et al*, 1932). Em 1954 a Du Pont produziu o polímero com uma massa molar maior e o patenteou. Todavia, o inconveniente apresentado pelo PLLA era sua suscetibilidade à reação com H₂O, o que levou a uma diminuição do interesse pelo material.

MOTTA & DUEK, 2005, descrevem que o PLLA pode ser sintetizado em uma grande faixa de massa molar através de dois processos: 1) Reação de policondensação direta do ácido lático levando a formação de produto de baixa massa molar 2) Reação de polimerização por abertura do anél dímero cíclico do ácido lático, na presença de um catalisador metálico gerando polímero de alta massa molar (MOTTA & DUEK, 2005).

No caso do poli(ácido lático), a quiralidade do carbono α permite a síntese de compostos enantiômeros, *levo* (L) e *destro*(D) rotatórios, dando origem a uma família de polímeros: poli(L-

ácido láctico) (PLLA), poli(D,L-ácido láctico) (PLDLA) e copolímeros de diferentes proporções. Devido à distribuição aleatória das unidades L e D na cadeia polimérica, o polímero racêmico não possui domínios cristalinos, sendo um material amorfo e com propriedades mecânicas significativamente menores quando comparados ao semicristalino PLLA (SAHA, *et al*, 2006).

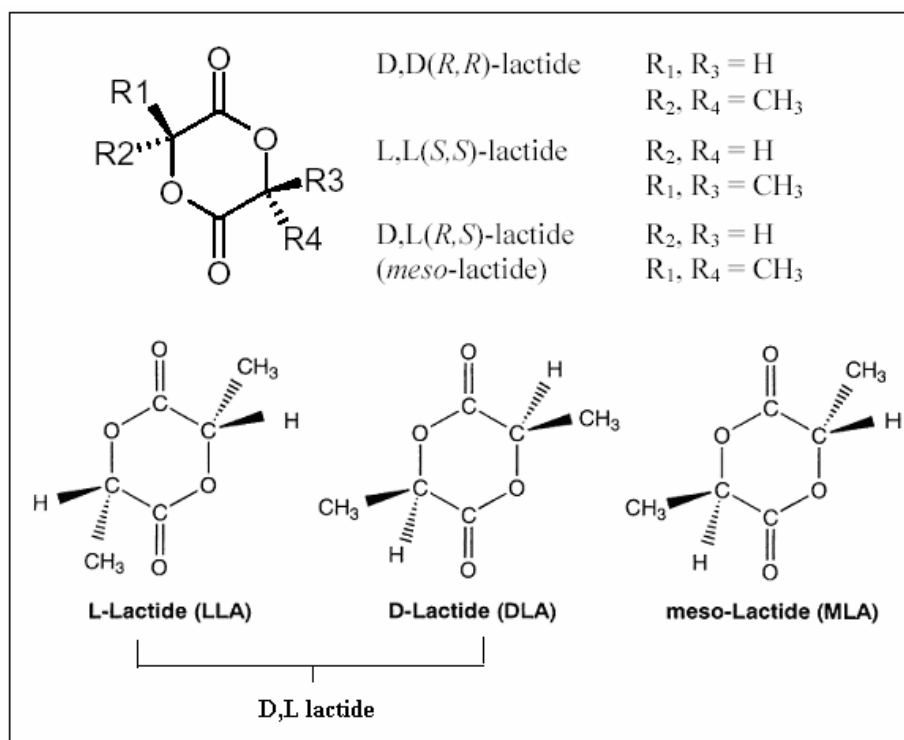


Figura 2.2: Estrutura química do diéster cíclico do ácido láctico e seus possíveis estereoisômeros (TSUJI, 2002).

As indicações de uso dos polímeros bioreabsorvíveis são muito bem estabelecidas e nos últimos anos verifica-se uma grande divulgação em novas aplicações como suporte para cultura de células na engenharia de tecidos. Assim, o material é preparado com características precisas que permitam o crescimento, a proliferação celular e a formação de um novo tecido (LUCCHESI, 2005), (PINTO, *et al*, 2005).

Outra aplicação desses materiais bioreabsorvíveis é o cultivo de células tronco mesenquimais indiferenciadas em arcabouços poliméricos na regeneração tecidual (HUANG, *et al*, 2004), (LI, *et al*, 2005), (PINTO, *et al*, 2004), (AMATO, *et al*, 2007).

2.3. Blendas Poliméricas

O estudo de blendas poliméricas tem demonstrado ser um caminho excelente para o desenvolvimento de novos materiais que exibem freqüentemente propriedades superiores aos seus componentes puros.

Uma das vantagens da mistura polimérica é a obtenção de materiais com novas propriedades e/ou otimizadas. Estas propriedades podem ser: rigidez, resistência ao impacto, tenacidade, estabilidade dimensional à alta temperatura, resistência a intempéries e outras (MANO & MENDES, 1999) (PAUL & NEWMAN, 1978). Outro fator importante é a relativa facilidade de obtenção de uma blenda, quando comparada com o desenvolvimento de novos polímeros (PAUL *et al.*, 1989).

Dependendo da compatibilidade termodinâmica dos polímeros escolhidos, podem ser obtidos sistemas com separação de fases ou não, impondo diferentes morfologias e características da matriz (PARK, 1992).

A maioria dos estudos de miscibilidade em sistemas poliméricos envolve polímeros amorfos. Entretanto, tem surgido grande interesse no estudo de sistemas compatíveis contendo pelo menos um componente cristalizável. Isto é devido parcialmente, ao fato de metade ou dois terços de todos os polímeros comerciais serem cristalinos e devido às blendas poliméricas semicristalinas oferecerem a possibilidade de estudo da cristalização e morfologia cristalina em relação a miscibilidade em polímeros. Sendo assim, a modificação de polímeros cristalizáveis por blendagem é um caminho muito promissor na obtenção da diversidade de novos materiais.

Blendas poliméricas onde ambos os componentes são semicristalinos são mais complexas, e conseqüentemente, abrem um novo caminho para o estudo das relações entre o comportamento das fases e o desenvolvimento da estrutura em misturas poliméricas.

As propriedades das blendas dependem principalmente da miscibilidade termodinâmica. Se os polímeros são imiscíveis, as propriedades dependerão não somente das propriedades de cada componente, mas também da morfologia e da adesão entre as fases. Para as blendas miscíveis busca-se um sinergismo entre as propriedades de cada polímero. Entretanto, a caracterização e a compreensão das propriedades só serão possíveis se o comportamento as fases for bem entendido.

As blendas miscíveis apresentam-se homogêneas em escala molecular, enquanto as imiscíveis apresentam em duas fases distintas. Estas últimas podem ainda sofrer uma modificação na interface e/ou morfologia, tornando-se blendas compatibilizadas ou ligas poliméricas, as quais possuem melhores propriedades mecânicas.

Uma definição um pouco mais abrangente diz que a blendas miscíveis apresentam-se como uma única fase, onde os componentes estão intimamente misturados havendo compatibilidade total, uma única Tg, transparência e boas propriedades mecânicas. Em contrapartida, as blendas imiscíveis apresentam-se em duas fases distintas, cada uma correspondente aos componentes individuais (processo denominado *separação de fases*), uma Tg para cada fase, opacidade, quando não compatibilizadas, baixa dispersão e adesão interfacial, e propriedades mecânicas insatisfatórias (KETUL,*et al*, 2007).

Na realidade, uma blenda miscível é uma solução de um polímero em outro, onde o polímero em menor concentração seria o soluto e o polímero em maior concentração seria o solvente. O termo solubilidade, porém, dificilmente é usado para se referir a uma blenda miscível, pois no início das pesquisas na área de blendas, as maiorias das blendas poliméricas eram consideradas imiscíveis, descartando-se este termo. As blendas poliméricas completamente miscíveis foram descobertas bem depois e só então passou a usar o termo miscibilidade. O termo compatibilidade é mais abrangente que o termo miscibilidade, sendo mais adequado para representar blendas com as propriedades finais desejadas. Desta forma, uma mistura de polímeros pode não ser miscível e ser compatível ao mesmo tempo, ou seja, ela pode apresentar duas fases e possuir as propriedades finais adequadas ou desejadas para aplicação em questão.

O crescente progresso científico e comercial na área de blendas poliméricas, a partir da década de 70, deve-se ao fato de que a produção de blendas pode ser realizada com maior rapidez que o desenvolvimento de novos polímeros (PAUL, 1989). Uma das vantagens da mistura de polímeros diferentes é que podemos combinar também suas propriedades, produzindo materiais para novas aplicações, nas quais os polímeros individuais não são adequados. Além da melhoria das propriedades mecânicas e físico-químicas, em alguns casos, a adição de um polímero a outro, resulta num material de melhores processabilidade e aparência final.

Blendas de polímeros bioreabsorvíveis têm sido investigadas em implantes biológicos. Estudos *in vivo* da blenda de PLDLA/PEO, após implantes subcutâneos em ratos, mostraram uma melhor resposta histológica de reação inflamatória no tecido do animal quando comparados com implantes desses mesmos materiais isoladamente (PINTO, *et al*, 2005). Estudos recentes com a blendas de poli(3-hidroxibutirato)/poli(ε-caprolactona) (P(3HB)/PCL) mostraram que a blenda apresenta um processo de degradação mais rápida quando comparada com a degradação de seus polímeros individualmente (VOGELSAGER, 2003), (DUARTE, *et al*, 2006).

PEZZIN, 2001, obteve blendas de poli(*p*-dioxanona)/poli(L-ácido láctico) (PPD/PLLA) para aplicação como prótese de menisco bioreabsorvível, e uma das conclusões é que o aumento de PPD acelera a degradação da blenda, sendo possível controlar a taxa de degradação variando-se a composição da mesma. (PEZZIN, *et al*, 2001).

Estudos de polímeros em aplicações ortopédicas têm sido crescente na tentativa de substituir o uso de dispositivos metálicos. O tempo no qual a prótese metálica funciona como um adesivo à tensão aplicada ao osso tem como consequência o desenvolvimento de uma estrutura óssea mecanicamente inferior devido a atrofia, pois o osso pára de ser submetido aos esforços.

2.4. Polímeros Bioreabsorvíveis em aplicações ortopédicas.

A fixação interna rígida com parafusos e placas de metal nas cirurgias ortopédicas da face favoreceu o prognóstico pós-cirúrgico nas últimas três décadas. A rígida estabilização dos segmentos ósseos estimula a otimização do ciclo de regeneração e propicia rápida recuperação desse tecido (SHAND & HEGGIE, 2000).

O aço foi o principal dispositivo de fixação até o surgimento de placas e parafusos de titânio. Com a introdução da relação de ósseo-integração (NIINOMI, 2007) os dispositivos de fixação interna rígida passaram a ser extremamente confiável e com baixa incidência de complicações, além de não causarem artefatos de técnica em exames radiográficos, permitindo visualizar com mais nitidez o resultado pós-operatório. Reações alérgicas e oxidações foram praticamente descartadas, ainda que a possibilidade do alojamento de partículas de titânio nos tecidos adjacentes e linfonodos regionais poderem causar intoxicação no nível celular (SHAND & HEGGIE, 2000).

No entanto, o íntimo contato ósseo com os dispositivos de fixação interna rígida que proporcionam estabilidade aos segmentos ósseos e bons resultados em longo prazo em adultos, é o mesmo mecanismo que produz resultados deletérios no processo de crescimento em crianças e adolescentes (KETUL, *et al*, 2007). Traumas da face com repercussão de fratura em ossos do terço médio implicam em intervenção cirúrgica imediata. Áreas pontuais na manutenção do crescimento e desenvolvimento facial podem estar envolvidas e devem sobremaneira ter suas características fisiológicas preservadas caso se queira a manutenção do padrão estético facial. Assim, ao considerar o uso de dispositivos de fixação metálicas nesses pacientes é imprescindível o conhecimento profundo do mecanismo de crescimento e desenvolvimento em atividade nesses indivíduos. (HIGUCHI, 2000).

Dessa maneira, tendo em vista os princípios científicos que atestam para a restrição do crescimento e desenvolvimento normais resultantes do uso de sistemas de fixação metálicos em crianças e adolescentes nas cirurgias crânio-faciais, a indicação alternativa por materiais bioreabsorvíveis se faz incontestável, já que são totalmente substituídos por tecido ósseo, e permitem o restabelecimento pleno da atividade fisiológica (NORHOLT, PEDERSEN & JENSEN, 2004).

Materiais bioreabsorvíveis têm sido usados por profissionais da saúde há mais de quatro décadas (LAINE, 2004). Inicialmente utilizados na forma de fios de sutura e membranas, diferem entre si pelas propriedades de manuseio e tempo de absorção, assim como os dispositivos para osteofixação (SUURONEN, 1998; LAINE, 2004). Na odontologia, os primeiros experimentos que se utilizaram de dispositivos biodegradáveis de fixação rígida foram conduzidos na área de

cirurgia bucomaxilofacial (CUTRIGHT, 1971). Apesar da bem documentada biocompatibilidade dos fios de sutura bioreabsorvíveis, dispositivos para osteofixação têm sido associados as complicações inflamatórias pós-cirúrgicas (BOSTMAN, 1991; BERGSMA, 1993; BOS, 1989) visto a obrigatoriedade do aumento das dimensões físicas do parafuso necessárias ao ganho em suas propriedades mecânicas, provendo estabilidade e suporte frente às forças físicas atuantes.

Além disso, estudos provenientes de escolas européias apontam como principal vantagem da fixação com parafusos e placas bioreabsorvíveis, a desnecessária segunda intervenção cirúrgica para remoção dos dispositivos nas cirurgias ortopédicas, incluindo as intervenções relacionadas ao terço médio da face. Os principais motivos para a remoção dos dispositivos metálicos enquadram-se na sensibilidade térmica ao frio, na palpação positiva substancialmente na área da espinha nasal anterior assim como raras possibilidades de oxidação e geração de reações alérgicas ao material (MEROLLI, 2001, NORHOLT, 2004).

A necessidade de remoção da fixação interna se encontra na ordem de 11,1% nas osteotomias. Nas mandibulares os números giram em torno de 12% (NORHOLT, 2004). Nessas ocasiões a razão mais comumente encontrada para tal fato foi a palpabilidade das placas e parafusos e principalmente a restrição ao crescimento quando utilizados em crianças e adolescentes.

Além disso, as propriedades de alto módulo de elasticidade e baixa flexibilidade das fixações metálicas divergem das características ósseas e passam a atuar como protetores frente às forças musculares que estão associadas ao mecanismo de estímulo à deposição mineral na formação e neo-formação óssea. A absorção dessas forças conduz ao quadro de osteoporose localizada gerada pela hipo-mineralização do tecido em restabelecimento (MIDDLETON & TIPTON, 2000).

Em pesquisas iniciadas durante a primeira metade do século XX para a utilização em nível industrial, os polímeros eram sintetizados a partir do ácido glicólico e outros poliésteres. No entanto foram deixadas em segundo plano, uma vez que os polímeros resultantes eram considerados muito instáveis ao longo do tempo para o uso em grandes atividades industriais. Mas esta indesejada instabilidade – decorrente da biodegradação – provou-se de grande

importância nos campos médicos e cirúrgicos nas últimas três décadas (MIDDLETON & TIPTON, 2000). Polímeros sintetizados a partir dos ácidos lático e glicólico tiveram a utilização iniciada nos anos 1960 e mostraram-se úteis em variadas aplicações quando os primeiros fios de sutura biodegradáveis foram aprovados (BOS, 1989).

Dispositivos de fixação interna biodegradáveis previnem os riscos de restrição ao crescimento e de migração passiva dos dispositivos metálicos decorrentes do uso em crianças e adolescentes com grande potencial de crescimento, assim como a palpabilidade permanente desses implantes em pessoas de qualquer idade (NORHOLT, 2004).

O processo de degradação é acompanhado pela diminuição física e da resistência mecânica do parafuso, que gradualmente é substituído por tecido ósseo. Sequencialmente as forças musculares são gradativamente direcionadas ao tecido em neo-formação e possibilitam o restabelecimento das atividades fisiológicas de deposição mineral, favorecendo a homeostasia funcional do sistema de equilíbrio entre os íons cálcio e fosfato. A degradação se processa inicialmente por hidrólise e posteriormente pela infiltração de células gigantes e macrófagos na fase final de absorção. A eliminação se processa pelo ciclo do ácido tricarbóxico pela metabolização em água e dióxido de carbono eliminados posteriormente pelos pulmões e rins (PELTONIEMI, 2002).

A biocompatibilidade desses materiais é ainda controversa. Inúmeros experimentos e dados clínicos suportam a boa receptividade tecidual quando implantados no osso. CUTRIGHT (1974) investigou diferentes poliésteres inseridos no fêmur de ratos e mandíbula de macacos rhesus. Os resultados mostraram a degradação e substituição do polímero por tecido fibroso, ósseo e medular sugerindo boa compatibilidade. A ausência de sinais de inflamação na fixação de fraturas mandibulares em cachorros (LEENSLAG *et al*, 1987), e o potencial osteogênico de copolímeros provenientes do ácido glicólico apontavam para a boa aceitação pelo osso hospedeiro (HOLINGER, 1986).

Sistemas de fixação rígida feitos de polímeros bioreabsorvíveis são alternativas viáveis aos problemas acima citados (LEENSLAG, 1987; BOS, 1989). Materiais bioreabsorvíveis e não radiopacos, não interferem com as atuais técnicas de diagnóstico por imagem. Assim, tornam

possível a avaliação dos fragmentos ósseos fixados e podem prover melhor detalhamento do pós-operatório (TSCHAKALOFF, LOSKEN & VON OEPEN, 1994; BOUWMAN & TUINZING, 1999). Mas o grande atrativo do ponto de vista humano e econômico, é não necessitar de segundo procedimento cirúrgico para sua remoção (EDWARDS, 2001; TURVEY, 2002).

A taxa de degradação do polímero e o potencial orgânico de eliminar o produto ácido final têm fundamental importância na reação tecidual local ao implante (SUURONEN, 1998; VAN DER ELST, 1998). Se o tecido circundante não puder restabelecer as condições normais de pH, reações inflamatórias e de corpo estranho poderão aparecer (SUGANUMA & ALEXANDER, 1993).

A lenta degradação é acompanhada pela substituição por tecido ósseo, que transfere gradualmente ao osso a carga funcional muscular conforme se desenvolve o processo de biodegradação e reorganização tecidual (SUURONEN, 1998; MIDDLETON & TIPTON, 2000).

Um aspecto que deve ser levado em conta quanto ao uso de um material polimérico para uma determinada aplicação biológica é seu formato (LANGER, 2004). Um material com arquitetura propícia pode melhorar o comportamento e interação polímero/tecido, auxiliando na regeneração, por exemplo, de um tecido ósseo (CHEN, *et al*, 2006).

CORAÇA, 2002 observou em polímeros com formato de pinos para aplicação em regeneração óssea a formação de fendas no material (PLLA/PEO) que permitiu o crescimento tecidual e celular para seu interior e melhor interação com o osso, quando comparado com implantes de PLLA puros (CORAÇA, 2002)

Até recentemente na fabricação de dispositivos de fixação, era necessário o uso de polímeros com alto teor cristalino para permitir resistência mecânica satisfatória. É o caso de parafusos de PLLA puros usados na fixação de fraturas do zigomático que foram associados às complicações como edemas e formação de cavidades císticas (NIINOMI, 2007; JEON, *et al*, 2007; JOSHUA, *et al*, 2007). O longo tempo de degradação (2 a 5 anos) em decorrência da presença de remanescentes cristalinos associados à acidificação do pH local durante o processo

de reabsorção, não permitiu a completa introdução desse material para uso clínico (HEIDEMANN, 2001).

O grau de cristalinidade gerada durante o processo de degradação *in vivo* é tido como fator preponderante nas complicações subseqüentes, como é o caso dos polímeros de PLLA puros, que podem gerar processos de inflamação crônica durante o ciclo de biodegradação em razão da alta cristalinidade envolta em sua morfologia (BOSTMAN, 1991; BERGSMA, ROZEMA, BOS *et al*, 1995). Além disso, polímeros como o PLLA mantêm suas propriedades mecânicas por tempo superior a três anos. Esse aspecto é desfavorável, pois raras são as evidências de que após tanto tempo o espaço uma vez ocupado pelo implante será substituído por tecido ósseo consolidado (MEROLLI, 2001).

Da mesma maneira, polímeros a base de ácido glicólico, uma das primeiras substâncias a serem clinicamente testadas, estão envoltas em casos de reações inflamatórias adversas (MEROLLI, 2001; SANTAVIRTA, 1990). BOSTMAN *et al* (1991) reafirmam a formação de reações de corpo estranho não específicas, associando a osteólise ao uso de parafusos de ácido poliglicólico (PGA) no fêmur de coelhos. Uma possível solução seria a utilização da forma amorfa de copolímeros de PLDLA, que não demonstraram em experimentos *in vitro* a formação de qualquer remanescente cristalino, degradando-se totalmente no período de 72 semanas. Reações inflamatórias de corpo estranho e complicações pós-operatórias, além da queda do pH local, não foram relatadas em experimentos que se utilizaram ratos e coelhos (HEIDEMANN, 2001). De acordo com VERHEYEN, DE GROOT & ROZING (1993) o PLDLA possui características de biocompatibilidade e termoplasticidade, estando fortemente indicado como dispositivo de osteofixação.

A manufatura de implantes por algumas técnicas, como por exemplo, a técnica de SR (self-reinforcing) permite a obtenção de parafusos menores, com melhores propriedades mecânicas e potencial para a manutenção da estabilidade durante a cicatrização óssea, inclusive aos polímeros de PLDLA. A estrutura morfológica nesses casos é composta por unidades de cadeias poliméricas orientadas em sentido único adquirindo a morfologia de cadeias fibrilares. Essa disposição física permite inclusive a dobragem e modelagem desses dispositivos de maneira a se adaptarem às características anatômicas do local cirúrgico. Além disso, provê características

de menor cristalinidade e peso molecular, favorecendo o processo e velocidade de biodegradação. (BOSTMAN, 1991; BERGSMA, ROZEMA, BOS *et al*, 1995; PELTONIEMI, 2002).

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das Blendas.

Foram obtidas blendas de PLDLA/PCL nas composições 100/0, 90/10, 80/20 e 70/30, utilizando uma mini-injetora Mini Max Molder modelo LMM - 2017. Após a fusão do material, obteve-se pinos com 3,1 cm de diâmetro.

As amostras foram colocadas dentro da panelinha da mini-injetora, e deixadas 1 min sem cisalhamento, seguido de 2 min com cisalhamento (velocidade de cisalhamento constante de 60 rotações por minuto). A temperatura de fusão foi de 200°C e a temperatura da camisa de aquecimento do molde foi mantida em 120 °C (Figura 3.1). Após a retirada do molde da injetora, esperou-se 8 minutos para a retirada da amostra.

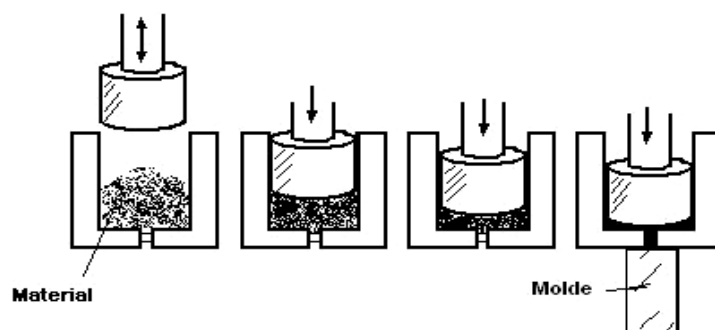


Figura 3.1: Preparo de suporte de polímeros bioreabsorvíveis pela técnica da fusão.

3.2. Degradação *in vitro* em tampão fosfato (pH 7,4)

Foram utilizadas 10 pinos para cada tempo de estudo, as quais foram imersas em tubos de vidro contendo solução tampão de fosfato salina 0,1 mol/L (PBS, pH 7, 4), em um banho termostaticado a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, conforme esquema da Figura 3.2

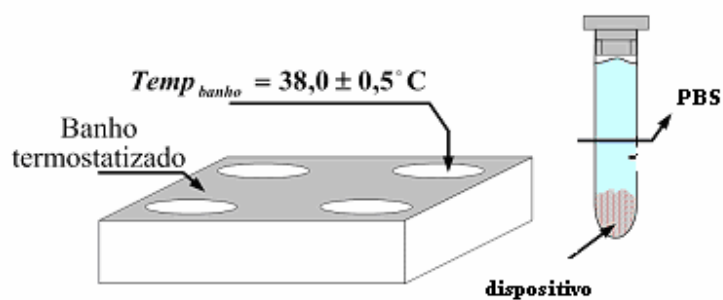


Figura 3.2: Desenho ilustrativo do estudo *in vitro* da degradação dos pinos.

Após períodos específicos (0, 7, 15, 30, 60, 120, 180 e 220 dias) os pinos foram retirados, lavados em água destilada, secos em estufa a vácuo a 50 °C por 8 h e caracterizados pelas técnicas de MEV, DSC, GPC e Ensaios Mecânicos.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras foi caracterizada por microscópica eletrônica de varredura utilizando-se um microscópio Jeol (JXA 840A). As amostras foram fraturadas em N₂ líquido e recobertas com ouro-paládio com metalizador Sputer Coater (Bal-Tec – SCD 050) com corrente de 40 mA durante 200 s, com tensão de operação em 10 kV. A análise das micrografias foi feita usando-se o programa *freeware ImageTool®*, fornecido no sítio da Universidade do Texas (EUA) (Texas Health Science Center, 2005).

3.3.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As medidas de DSC foram realizadas em um equipamento TA Instruments, sob fluxo de N₂. Amostras pesando de 6 a 11mg foram seladas em panelas de alumínio e aquecidas de 25 a 200°C a uma taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹ (primeiro aquecimento) e mantidas a esta temperatura por 1 minuto. Subseqüentemente elas foram resfriadas a -100°C a uma taxa de 5°C.min⁻¹ e mantidas a esta temperatura por 5 minutos. As blendas foram aquecidas a 200°C a uma taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹ (segundo aquecimento).

3.3.3. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Os valores das massas molares em número (M_n), em massa (M_w) e o índice de polidispersão (I.P) foram realizadas em um cromatógrafo líquido WATERS-1525, utilizando-se colunas ultrastyrigel e detector de índice de refração WATERS-2414. Foram utilizados padrões de poliestireno para calibração de THF (tetrahidrofurano) como fase móvel.

3.3.4. Ensaio Mecânico de Flexão

Amostras foram submetidas a ensaios de flexão pelo método de três pontas, segundo a norma ASTM D790-95^a, em uma MTS TestStar II, utilizando uma célula de carga de 50 kgf, a uma velocidade de 1, mm/min. A distância entre as duas extremidades era de aproximadamente 19 mm. A tensão e o módulo de elasticidade foram determinados por meio das Equações 1 e 2, respectivamente (ASTM , 2003) para as amostras na forma de placas:

$$\sigma = 3PL_0 / 2bt^2 \quad \text{Equação 1}$$

onde: σ é a tensão (MPa); P é a carga máxima (N); L_0 é a distância entre as pontas (mm) ; b é o comprimento do dispositivo (mm) e t é a sua espessura (mm).

$$\varepsilon = L^3 m / 4bt^3 \quad \text{Equação 2}$$

onde: ε é o módulo de elasticidade (MPa); m (N/mm) é a inclinação do gráfico força x deslocamento.

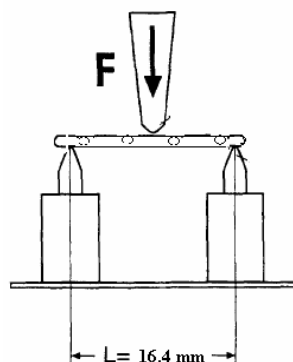


Figura 3.3: Ilustração do ensaio de flexão pelo método de 3 pontas.

3.4. Implante dos pinos. Estudo *in vivo*

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos, com idade aproximadamente de três meses e pesando aproximadamente 300 gramas. Esses animais foram provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, no Centro de Ciências Médicas e Biológicas de Sorocaba (CCMB.PUC-SP). Estes animais permaneceram no Biotério recebendo ração comercial e água “*ad libitum*”.

Foram implantados um total de 24 animais, os quais foram divididos em dois grupos: 12 (doze) animais implantados com pinos puros de PLDLA e 12 (doze) animais implantados com pinos das blendas PLDLA/PCL (70/30). Cada grupo de 12 ratos foram subdivididos em diferentes tempos de implantes: 7 (sete), 15 (quinze), 30 (trinta), 80 (oitenta), 120 (cento e vinte) e 180 (cento e oitenta) dias.

Os ratos foram pesados e logo após submetidos a anestesia geral com uma solução de Ketamina 10% (100mg/Kg) mais Cloridrato de Xylazina 2% (6mg/Kg) por peso corporal, administrados via intramuscular.

Os animais foram submetidos a tricotomia da região medial das patas traseiras, e as mesmas sofreram assepsia. Logo em seguida foi realizada uma incisão longitudinal na pele de aproximadamente 2 (dois) cm ao longo da borda anterior da tíbia. Com auxílio do bisturi, o

tecido muscular foi seccionado e afastado até a exposição do periósteo e do tecido ósseo. Com o uso de um mini-motor de baixa rotação (odontológico) Beltec, e uma broca Carbide de 2mm de diâmetro, foi produzida uma cavidade no terço superior da tíbia.

A cavidade foi produzida na camada cortical atingindo o canal medular, permitindo a introdução do pino. Este procedimento foi realizado em apenas uma das patas de todos os animais (Figura 3.4).

O tecido muscular e a pele foram suturados, logo em seguida à implantação dos pinos, e aplicado em sua superfície solução anti-séptica para a prevenção de infecções.

Finalizado os períodos de 7, 15, 30, 80, 120 e 180 dias pós- cirúrgicas, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia com solução de Hidrato de Cloral 10% na dose 400mg/Kg. Em seguida as tíbias foram dissecadas e o segmento de cada uma delas contendo o material implantado foi fixado em paraformoldeído 4%, para análise histológica.



Figura 3.4: Procedimento cirúrgico para implante dos pinos em tíbia dos animais.

3.5. Processamento do material

Primeiramente o material foi submetido à descalcificação em solução de ácido nítrico a 5%.

As amostras foram preparadas para análise histológica de acordo com as técnicas utilizadas para Microscopia de Luz, utilizando-se historesina como meio de inclusão. As lâminas foram analisadas em um microscópio óptico (marca NIKON – E-800).

3.5.1. Microscopia de Luz, inclusão em historesina (glicolmetacrilato).

O processamento consistiu, inicialmente, na fixação do material em líquido de paraformaldeído a 4%, por um período de 24 horas à temperatura ambiente. Após a fixação do material, foram realizados os seguintes procedimentos:

1. Lavagem em PBS 0,05M trocando a solução três vezes a cada 10 minutos.
2. Desidratação: etanol a 70%; etanol a 80%; etanol a 95% e etanol a 100%.
3. Pré-embebição: álcool absoluto / resina na proporção 1:1 durante 3 horas, na temperatura ambiente (para cada 50mL do componente básico, colocou-se 0,5g de peróxido de benzoíla e agitou-se por 20 minutos).
4. Embebição: resina pura por 48 horas, em dessecador a vácuo a 4°C.
5. Polimerização: resina com endurecedor mantendo-se em gelo após o endurecimento colocou-se em moldes na estufa a 37°C por 48 horas (para cada 15mL de resina preparada, colocou-se 1mL de endurecedor)
6. Corte histológico em micrótomo e preparação das lâminas.

3.5.2. Inclusão em Parafina

O processamento consistirá, na fixação do material em paraformaldeído 4%, por um período de 24 horas à temperatura ambiente. Os fragmentos serão descalcificados numa solução de ácido nítrico 5%. Após a descalcificação, serão lavados em água destilada, desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados e embebidos em parafina.

Os preparados foram seccionados em navalhas descartáveis em micrótomo Leica RM 2145 a uma espessura de 5µm. Prosseguiu-se com a coloração por Hematoxilina e Eosina.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS ESTUDOS IN VITRO.

4.1. Estudo da degradação *in vitro*

A degradação *in vitro* dos suportes de polímeros bioreabsorvíveis representa uma etapa básica e fundamental para o preparo de suportes adequados às aplicações. As condições do ensaio podem ser controladas, os custos reduzidos e, os produtos e subprodutos de degradação, mensurados de maneira precisa (LUCIANO *et al.*, 2003).

Aplicados aos polímeros bioreabsorvíveis os ensaios são, na grande maioria, realizados em solução tampão fosfato, pH 7,4, simulando as condições de osmolaridade e pH fisiológico. No plasma sanguíneo, os valores do pH podem variar de 7,37 a 7,42 no sangue arterial (média de 7,4) e 7,37 no sangue venoso. No organismo, o líquido extracelular é normalmente mantido em pH 7,4 e os mecanismos que mantêm esse valor constante incluem o tamponamento e as compensações respiratória e renal.

Os principais tampões extracelulares são o bicarbonato e o fosfato, sendo o tampão de bicarbonato utilizado como primeira linha de defesa quando ocorrem distúrbios na concentração de íons H^+ . Já nos líquidos intracelulares, o pH é mantido em aproximadamente 7,1 e o tamponamento ocorre pelos fosfatos orgânicos, como o tri, di e monofosfato de adenosina (ATP, ADP e AMP, respectivamente) (COSTANZO, 1998).

A curva sigmóide de titulação do fosfato (pK 6,8) pode ser comparada à do bicarbonato (pK 6,1). No seu trecho linear, os valores de pH estão compreendidos entre o pH 5,1 até o pH 7,1 no tampão bicarbonato, e entre pH 5,8 até o pH 7,8 no tampão fosfato. Apesar dos valores do tampão de bicarbonato ficarem fora da faixa de tamponamento para o pH 7,4, ele é considerado o tampão fisiológico mais eficiente, pois o CO₂, volátil, pode ser expirado pelos pulmões. Apesar de mais eficiente, os ensaios *in vitro* são dimensionados de maneira que o sistema seja fechado, assim o uso do tampão fosfato torna-se preferencial. Outra justificativa para o uso do tampão fosfato são os extensos dados da literatura, que podem ser utilizados comparativamente aos obtidos pelo experimento apresentado neste trabalho.

4.1.2. Análise Macroscópica.

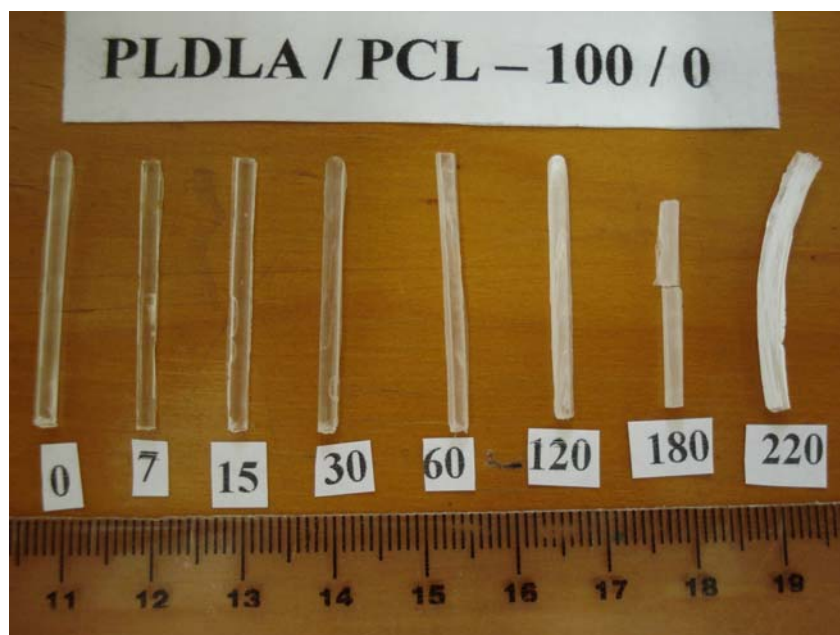


Figura 4.1: Acompanhamento visual do processo de degradação (em dias) dos pinos de PLDLA/PCL (100/0).

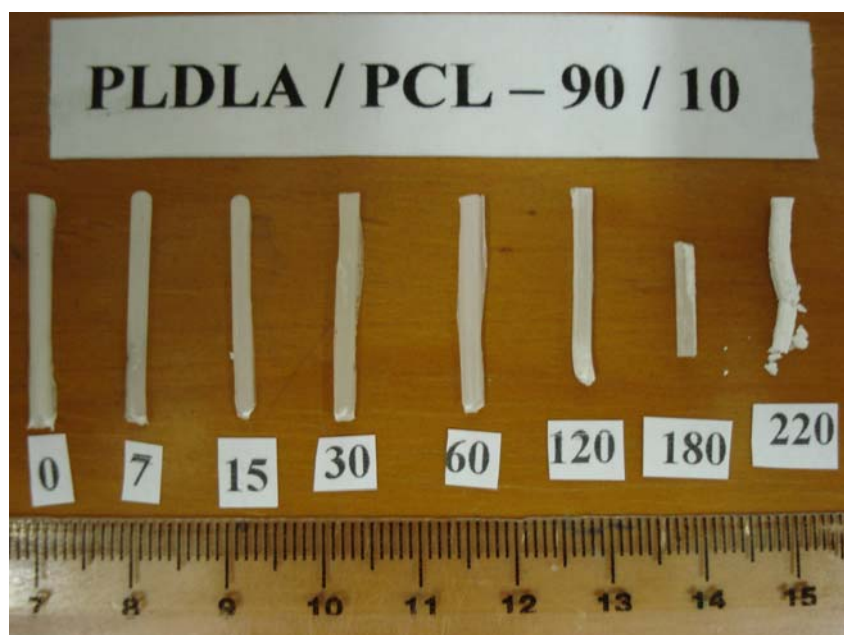


Figura 4.2: Acompanhamento visual do processo de degradação (em dias) dos pinos de PLDLA/PCL (90/10).

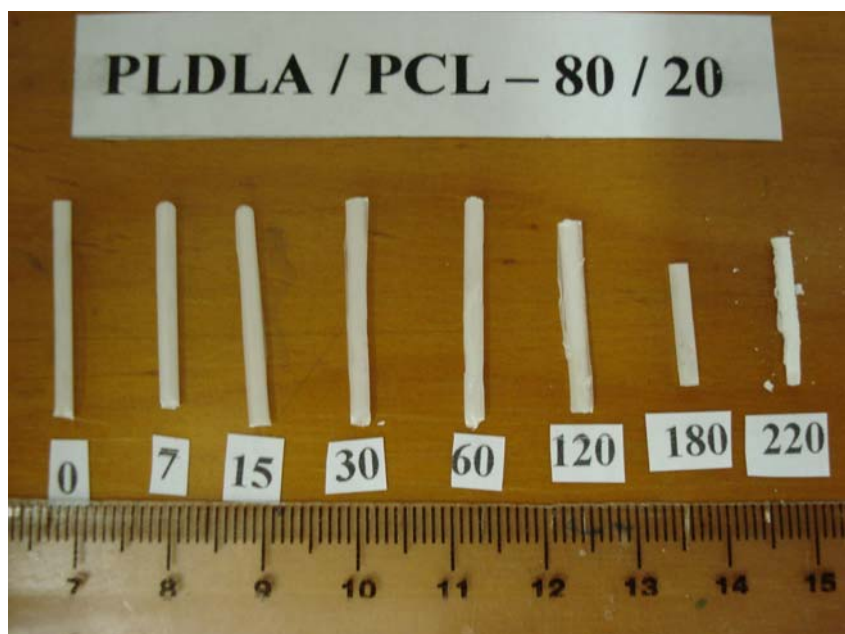


Figura 4.3: Acompanhamento visual do processo de degradação (em dias) dos pinos de PLDLA/PCL (80/20).

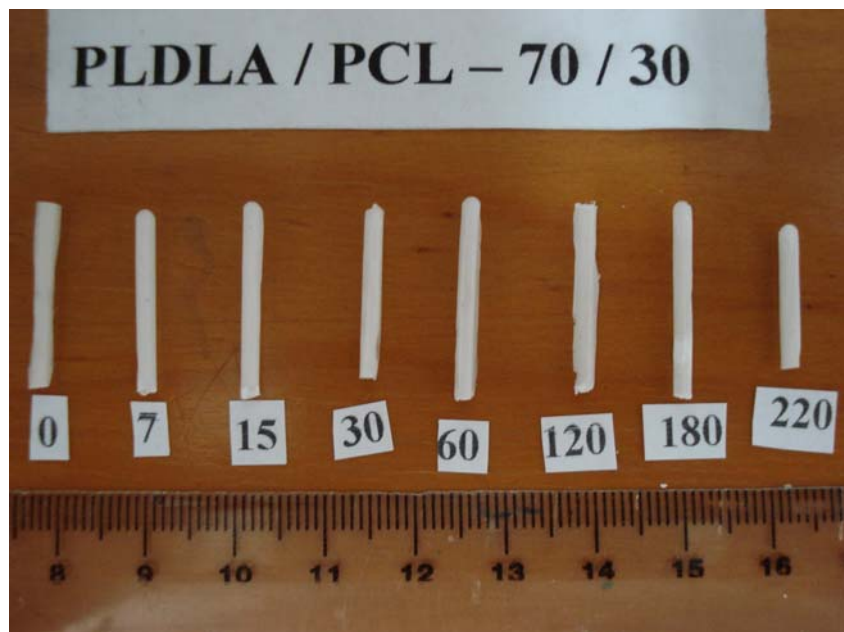


Figura 4.4: Acompanhamento visual do processo de degradação (em dias) dos pinos de PLDLA/PCL (70/30).

Na figura 4.1, puro PLDLA, podemos observar um material com aparência transparente no tempo zero até o tempo de 60 dias. Após o período de 120 dias, o material apresenta uma aparência esbranquiçada a qual se intensifica até o período de 220 dias, indicando o processo de degradação. As imagens revelam, que o material mostra-se resistente, não maleável durante 180 dias e no período de 220 dias apresenta -se completamente quebradiço mostrando um processo de degradação intenso.

Nas figuras 4.2 e 4.3, nas imagens das blendas PLDLA/PCL (90/10) e (80/20), pode-se observar, no tempo zero, um material com aspecto leitoso, possivelmente adquirido pela adição de PCL na blenda. Esse aspecto se manteve durante todo o período de degradação, não sendo possível notar mudanças significativas na coloração. Até o período de 180 dias, esses dois tipos de materiais mantiveram-se suas propriedades físicas íntegras, com resistência ao manuseio, porém, ao analisarmos esses materiais após o 220 dias, pode-se notar a completa degradação dos pinos, não sendo possível manuseá-los.

Na blenda 70/30 (figura 4.4), o mesmo pode ser observado a respeito da coloração referente as demais blendas estudadas até o período de 180 dias. Uma grande diferença observada nesse material foi que, mesmo após 220 dias em tampão fosfato, o material mostrou-se íntegro e com suas propriedades físicas macroscópicas sem grandes deformações, sendo de fácil manuseio.

4.2. Ensaio Mecânico de Flexão.

A tabela 4.1 mostra a variação do Módulo de Young (E) e Tensão Máxima na Ruptura, em função do tempo de degradação para as blendas de PLDLA/PCL. Verifica-se uma diminuição nos valores do módulo com o aumento da composição de PCL na blenda. Conforme dados mostrados na tabela 4.1, esses valores atingem 3130 MPa para a blenda PLDLA (100/0) enquanto a blenda (70/30) atinge 1925 MPa. Um comportamento semelhante é observado nos dados de tensão máxima na ruptura, onde os valores mais altos estão representados pelos pinos com PLDLA puro e à medida que é acrescentado PCL, esses valores diminuem (Tabela 4.1).

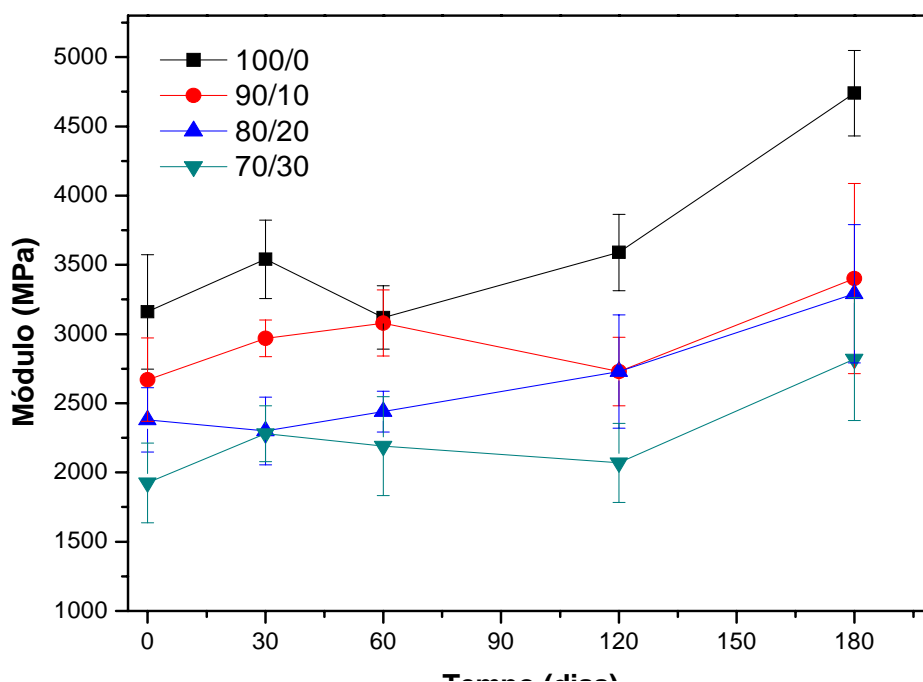


Figura 4.5 – Módulo de Young (E) das blendas de PLDLA/PCL 100/0, 90/10, 80/20 e 70/30 em função do tempo de degradação.

Quando se analisa o comportamento mecânico para todas as blendas durante o período de 30, 60 e 120 dias de degradação *in vitro*, não se verifica variações nos valores do Módulo de Young (E), indicando que esses materiais não perdem suas propriedades mecânicas de modo significativo durante esse período (figura 4.5).

O aumento significativo do módulo de Young nas blendas no período de 180 dias de degradação, também no polímero puro, deve ser atribuído a uma reorganização das cadeias poliméricas. Com a degradação e, conseqüente diminuição da massa molecular, o rearranjo das cadeias de menor tamanho permite um maior número de ligações intermoleculares secundárias, produzindo assim uma resistência adicional (DUEK *et al.*, 1999). Como a reação do aumento do Módulo de Young ocorreu de forma mais acentuada no PLDLA puro, acredita-se que esse rearranjo das cadeias faça com que esse material se torne mais cristalino. Como podemos observar, todos os materiais apresentaram um aumento no seu módulo no período de 180 dias, porém, em proporções menores, o que nos leva a acreditar que esse fenômeno do aumento do módulo de Young esteja relacionado com a quantidade PLDLA contida nas blendas (Figura 4.5). Quanto maior a quantidade de PLDLA maior o módulo em 180 dias. A partir do momento em que se adiciona o PCL, o valor do módulo, apesar de crescente, é menor em 180 dias, comparando-se com o PLDLA puro.

Os valores da força máxima na ruptura, (tabela 4.1), apresentam-se estáveis até 120 dias e a partir desse tempo tende a diminuir. Esse efeito é mais pronunciado nas blendas quando comparados ao polímero puro. Esse fato pode estar relacionado à miscibilidade da blenda, conforme já mostrado nos resultados de DSC. Quanto maior a composição de PCL na blenda, maior esse efeito (tabela 4.1).

A tendência natural dos polímeros bioreabsorvíveis em meio aquoso é a quebra hidrolítica de suas cadeias ocasionando sua degradação e com isso a perda de sua massa molar. Quando maior o tempo em meio aquoso, maior degradação e perda de massa molar desses materiais, conseqüentemente, perda das propriedades mecânicas (PIETRZAK, *et al.*, 1997).

A sucinta perda das propriedades mecânicas está correlacionada com a não degradação dos materiais ou uma degradação em proporções muito baixas. Através de diversas composições e formações de blendas podemos apresentar materiais cada vez mais adequados para o uso médico em ortopedia podendo assim estabelecer materiais com características específicas para determinadas aplicações, sendo possível estabelecer um controle do material, morfologia e resistência mecânica (FERREIRA, *et al*, 2002 e SUNG, *et al*, 2005).

Pesquisas realizadas na área de ortopedia revelam que um fator limitante para o uso dos materiais é a diminuição (ao decorrer do tempo) das propriedades mecânicas nos dispositivos para fixação óssea, dificultando assim, a difusão celular para o material e o processo de transferência de cargas entre material e o tecido (FANG, *et al*, 2005).

Os valores apresentados nesse trabalho com relação ao módulo de flexão, mostram ser de grande interesse em aplicações biológicas, visto que a diminuição das propriedades mecânicas em relação ao tempo de degradação *in vitro* foram mínimas.

Quando o osso é acometido por algum tipo de fratura, o organismo leva aproximadamente 4 meses para restabelecê-lo completamente, por esse motivo, materiais utilizados como dispositivos em ortopedia devem manter suas propriedades mecânicas para que o osso possa se recompor sem a ocorrência de novas fraturas (FERREIRA, *et al*, 2002).

Os materiais aplicados em cirurgias para reconstrução óssea devem permitir a consolidação da fratura pela formação do calo ósseo. Durante a sua formação, o calo necessita receber estímulo mecânico e, dessa forma, o polímero deve ter iniciado seu processo de degradação com perda gradativa das propriedades mecânicas. Com a consolidação da fratura, o dispositivo polimérico deve ser reabsorvido completamente, não sendo necessária uma segunda intervenção cirúrgica para sua retirada (SAKATA, 2004 & MIDDLETON, *et al*, 2000). Considerando dados das propriedades mecânicas do osso cortical ($E \approx 17$ GPa) (LAKES, 1999), verifica-se que as blendas desenvolvidas nesse trabalho, apesar de diferir nos valores do módulo em relação ao osso, são comparáveis com outros polímeros. FERREIRA, *et al*, 2002 desenvolveram pinos da blenda PLLA/PHBV e obteve Módulo de Young (2,3 GPa) e (100 MPa) para o teste de tensão máxima, nos pinos sem degradação.

Apesar das fixações metálicas utilizadas nos tratamentos de fraturas ósseas serem um procedimento bem sucedido, o osso cortical e o metal possuem propriedades mecânicas bem diferentes . A elasticidade constante do osso é apenas 1/10 daquele do implante metálico, enquanto a força de tensão é dez vezes menor, levando assim a uma osteoporose causada pela ausência funcional normal. Desse modo, os resultados das análises das propriedades mecânicas apresentadas nesse trabalho, tornam-se de grande importância em estudos ortopédicos, visto que, apesar das características mecânicas desses polímeros bioreabsorvíveis apresentarem-se abaixo dos valores do osso cortical, esses materiais, ao contrário dos metais, degradam numa velocidade que permite uma transferência gradual da tensão do implante do osso que está sendo regenerado, prevenindo assim o acúmulo de tensão no tecido.

De qualquer forma, os resultados do estudo *in vitro* apresentados têm o objetivo de servir somente como um simples modelo do comportamento do estudo *in vivo* dos implantes bioreabsorvíveis, tendo em vista que quando implantados esses dispositivos podem estar em contato com vários tecidos que podem afetar as características de degradação dos implantes.

Tabela 4.1 : Módulo de Young (E) e Força Máxima no ensaio mecânico de flexão de amostras densas e porosas de PLDLA/PCL em função do tempo de degradação em tampão fosfato.

Ensaio Mecânico de Flexão																
PLDLA/PCL																
Dias	Módulo de Young (E) (MPa)								Força Máxima (MPa)							
	100/0	SD	90/10	SD	80/20	SD	70/30	SD	100/0	SD	90/10	SD	80/20	SD	70/30	SD
0	3352.5	364.5	2820	159.4	2527.5	88.8	1979.2	135.3	143.7	16.6	123.2	15.6	113.9	9.0	95.7	11.9
30	3436	143.6	23004	112.4	2432.5	156.3	2226	173.8	150.2	30.5	120.3	13.2	102.2	18.8	100.6	3.7
60	3180	182.3	3152	192.5	2384	59.4	2324	168.1	138.4	31.1	125.5	10.2	109.9	10.2	98.2	14.2
120	3666	237.6	2806	166.5	2945	312.4	2235	167.8	147.0	16.5	112.8	7.0	105.1	10.0	91.2	9.7
180	4860	160.8	3477.5	367.9	3292.5	345.1	3057.5	313.4	142.3	15.43	77.7	14.14	81.4	9.33	84.5	8.78

(SD): Desvio Padrão

4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Blendas PLDLA/PCL preparadas por fusão no formato de pinos foram degradadas *in vitro*, fraturadas em nitrogênio líquido e observadas ao MEV.

Os pinos das blendas (100/0, 90/10, 80/20 e 70/30) foram observados e fotomicrografados antes ($t = 0$) e após 120, 180 e 220 dias de degradação em tampão fosfato.

As análises das micrografias dos pinos no tempo zero indicam amostras com morfologia densa e compacta para todas as composições das blendas, revelando superfícies de fraturas lisas com leves irregularidades e sem presença de poros em todas as composições (figura. 4.6). Comparando-se as amostras puras de PLDLA (figura. 4.6- A, B) com as blendas 90/10 (figura 4.6-C,D), 80/20 (figura. 4.6-E,F) e 70/30 (figura. 4.6-G,H) no tempo zero de degradação não foi possível verificar diferenças significativas entre a morfologia dos pinos.

Não foram observados nas blendas com maior quantidade de PCL (30%) um aglomerado do material característicos em amostras com 100% de PCL (BARBANTI, 2005).

A observação das superfícies das fraturas das amostras após 120 dias de degradação em tampão fosfato indicam que todas as blendas são densas (Figura 4.7) e possuem as mesmas características morfológicas sem nenhum indício de degradação aparente.

As blendas observadas em MEV após 120 dias de degradação não apresentaram degradação. Mesmo o PLDLA, um copolímero amorfo com característica de rápida degradação *in vitro*, apresenta uma morfologia densa (Figura.4.7-A,B). Possivelmente o processo de obtenção do material pelo método de fusão deixa o material mais compacto dificultando a passagem de água para o interior do pino, retardando o processo de degradação do mesmo (DUEK, *et al.*, 1999), (REZWAN, *et al.*, 2006).

As blendas 90/10 (figura. 4.7-C,D) 80/20 (figura. 4.7-E,F) e 70/30 (figura. 4.7-G,H) não apresentaram mudanças morfológicas no período de 120 dias de degradação. A adição de PCL nas blendas, possivelmente, faria com que o material demorasse mais tempo para iniciar o

processo de degradação, porém, como a quantidade de PCL é menor que a do copolímero PLDLA, esse fato não fica bem esclarecido.

Nas amostras observadas em MEV após 180 dias em tampão fosfato revela que o polímero puro de PLDLA (Figura 4.8-A,B) não apresenta aparentemente um processo de degradação. O mesmo ocorre com a blenda 90/10 (PLDLA/PCL), não sendo visível em microscopia sua degradação (Figura 4.8- C,D).

Nas amostras que contém maior quantidade de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), no tempo de 180 dias, pode se observar um processo de degradação. A blenda 80/20, apresentou um início de degradação aparente, com orifícios na sua superfície (Figura 4.8- F), porém, quando observado em fratura, seu interior mostra-se denso e sem sinais de degradação (Figura 4.8- E).

A blenda contendo 30% de PCL foi a que apresentou o maior degradação. Podemos observar que a degradação interna do pino encontra-se em estágio bem adiantado (Figura 4.8,G), apresentando cavidades irregulares de diversas proporções (Figura 4.8- F). Acredita-se que a imiscibilidade entre PLDLA e PCL possa ter ocasionado tal evento na blenda 70/30. Segundo BARBANTI, 2005, a poli(ϵ -caprolactona) é um polímero que apresenta um tempo de degradação mais lento quando comparados com outros polímeros, como por exemplo o poli(L, ácido láctico-co-D,L ácido láctico). Possivelmente, nesse período de 180 dias de degradação em tampão fosfato, houve a perda de massa e das propriedades mecânicas de PLDLA. Assim por apresentar imiscibilidade com PCL, após esse período de degradação possivelmente ocorreu uma menor interação entre os polímeros, ocasionando então um possível desprendimento do material, deixando somente o local em PCL ocupava na blenda como visto na figura 4.8- H.

Após 220 dias de degradação, todos os pinos, em todas as composições apresentaram se completamente degradados. No copolímero PLDLA podemos observar uma superfície com sinais de degradação apresentando fendas em várias regiões (Figura 4.9-A), e quando observado a superfície da fratura do mesmo material, podemos verificar um material completamente degradado, com trincas em todo seu interior (Figura 4.9- B). O mesmo pode ser observado na blenda 90/10 após o período de 220 dias. Esse material apresentou vários sinais de degradação em sua superfície, porém o mais interessante foi que nas fotomicrografias de superfície da

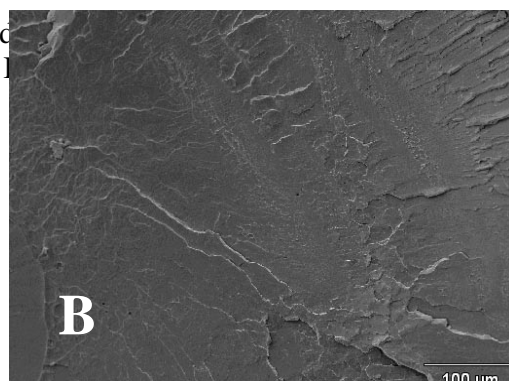
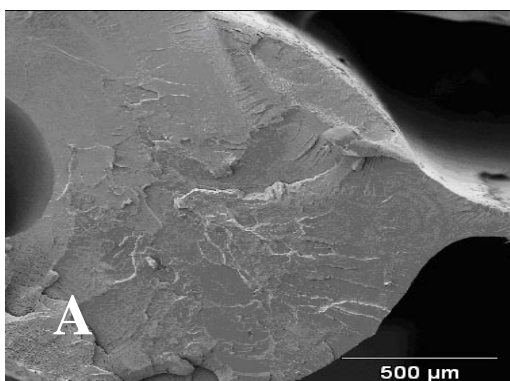
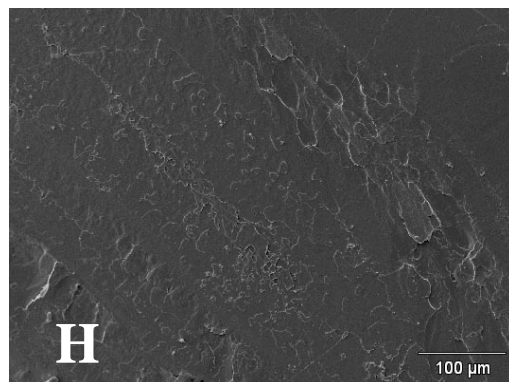
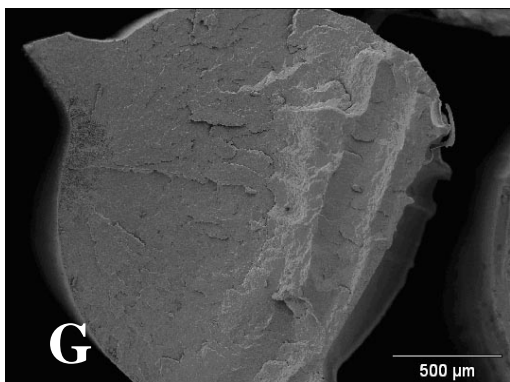
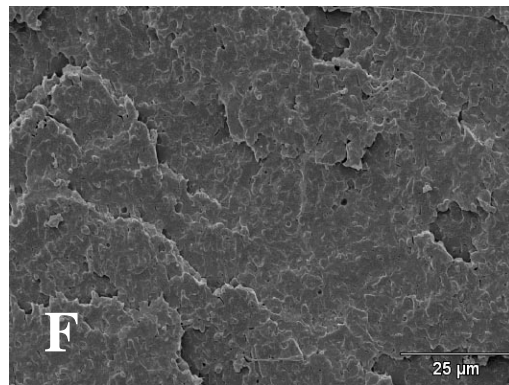
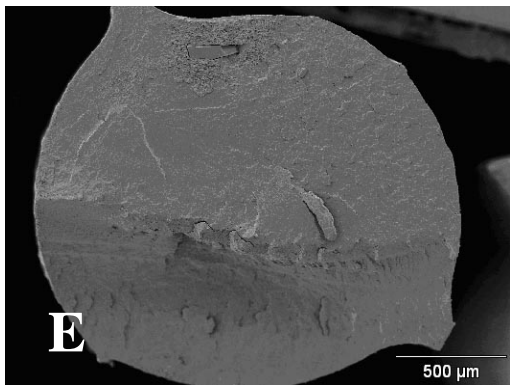
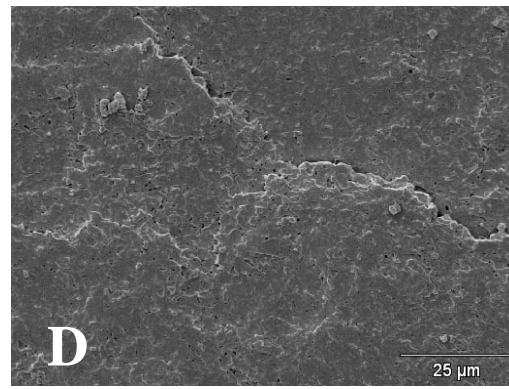
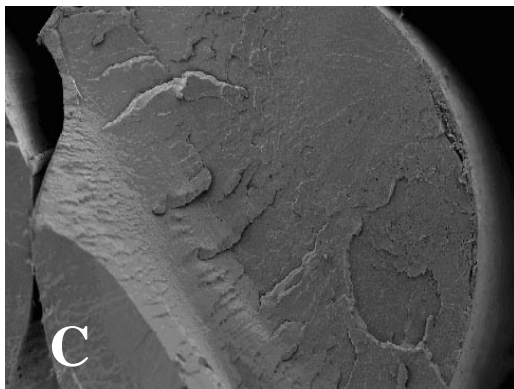
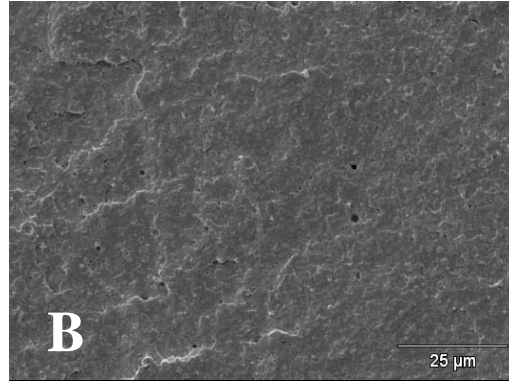
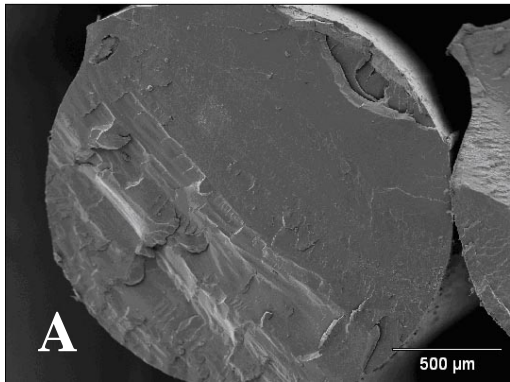
fratura, pode se observar um processo intenso de degradação além de apresentar uma superfície irregular não lisa e sim porosa (Figura 4.9 –C,D). A blenda 80/20 foi o material que apresentou a superfície mais irregular no período de 220 dias de degradação, com aspecto rugoso por toda a sua extensão (Figura 4.9-E), quando observado a superfície da fratura, esse material apresentou também um material completamente degradado (Figura 4.9-F).

Na blenda PLDLA/PCL (70/30), como pode ser observado, no período de 180 dias, já apresentava um processo adiantado de degradação na superfície da fratura. No período de 220 dias de degradação em tampão fosfato, esse fato se repete com maior intensidade mostrando se poroso e com grande rachaduras (Figura 4.9-H). Nas imagens de superfície, blenda 70/30 é a que apresenta maior degradação quando comparada com materiais em outras proporções de PCL (Figura 4.9-G)

A estabilidade morfológica apresentada pelo dispositivo, até o período de 120 dias, está de acordo com os resultados verificados por outras técnicas, como as que avaliaram as propriedades térmicas do dispositivo durante o período de degradação em tampão fosfato. A técnica de DSC mostrou que a Tg do copolímero e das blendas mantiveram-se inalteradas durante esse período de degradação do estudo *in vitro*.

Os resultados de MEV para os pinos, durante o tempo de degradação, podem ser relacionados também com as propriedades mecânicas desses dispositivos, podendo ser verificado que durante o decorrer do período de degradação a morfologia dos dispositivos continua densa ao mesmo tempo em que a % de perda de propriedade mecânica é baixa.

O estudo da degradação dos polímeros é importante para o entendimento de seus possíveis usos, de sua reciclagem e de seu descarte. Porém, os processos de degradação térmicos e oxidativos dos polímeros bioreabsorvíveis ainda são pouco entendidos, sendo ainda bastante especulativos (AOYAGI, *et al*, 2002, SAKATA, *et al*, 2004).



varred
. A e I

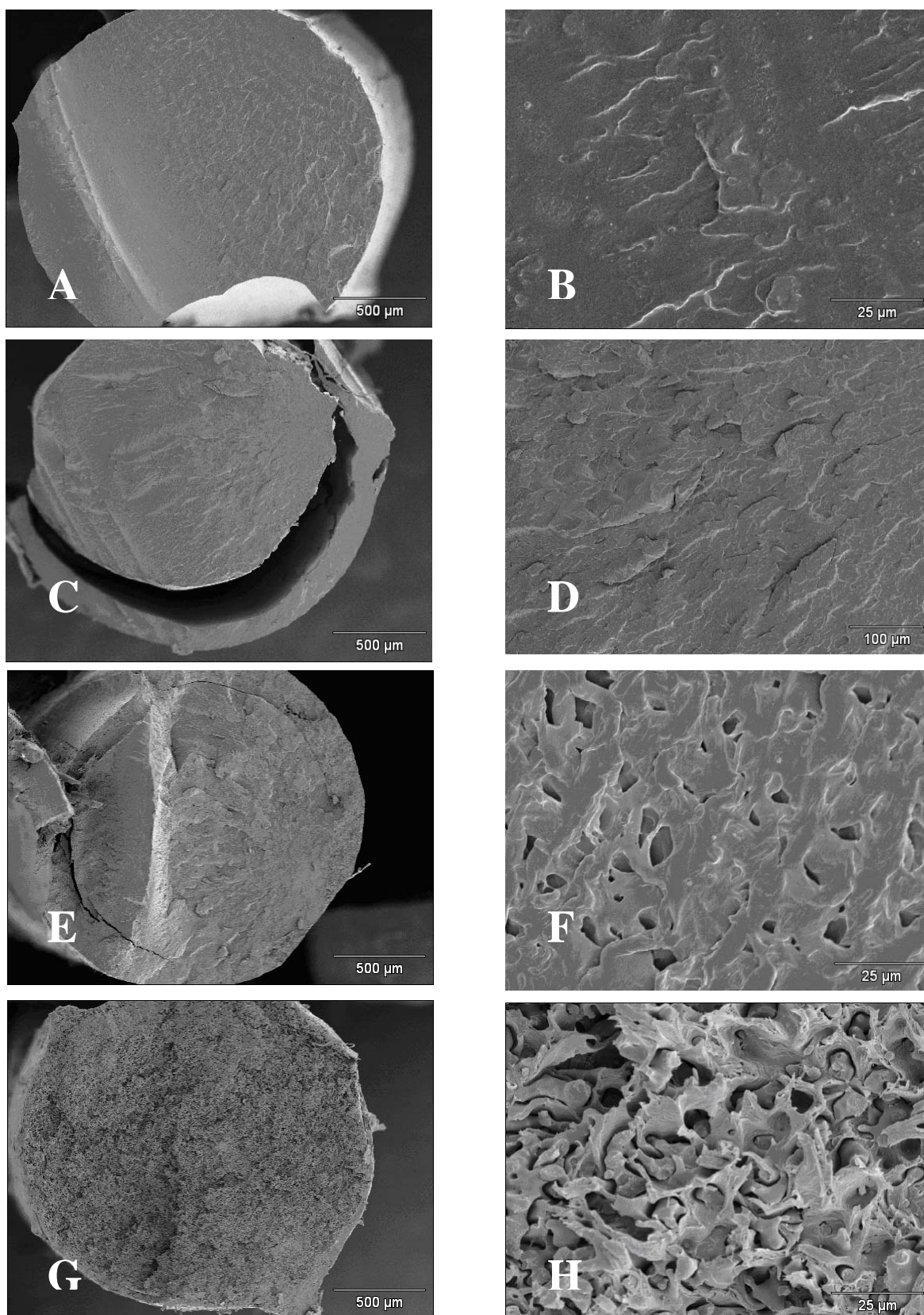


Figura 4.8: Microscopia eletrônica de varredura da Blenda de PLDLA/PCL após 180 dias de degradação em diferentes composições. A e B (100/0), C e D (90/10), E e F (80/20) , G e H (70/30).

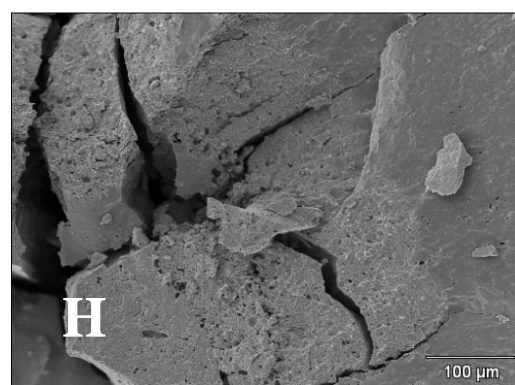
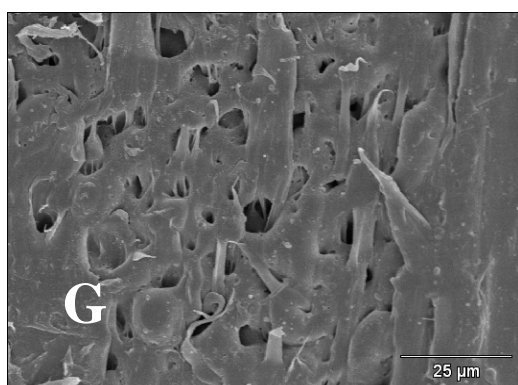
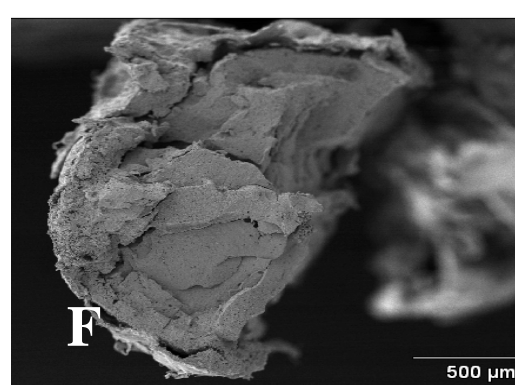
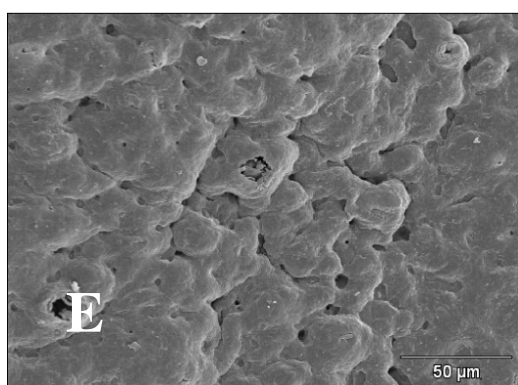
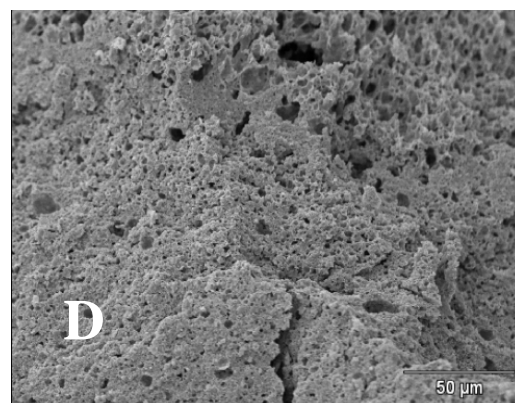
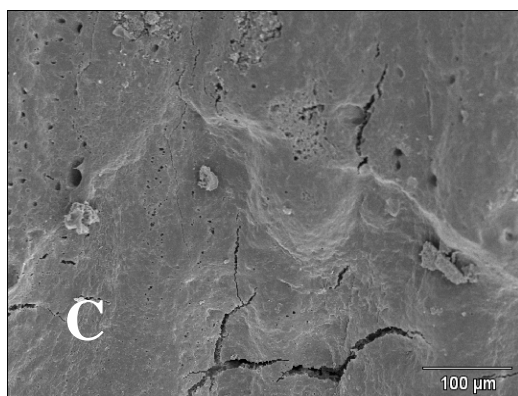
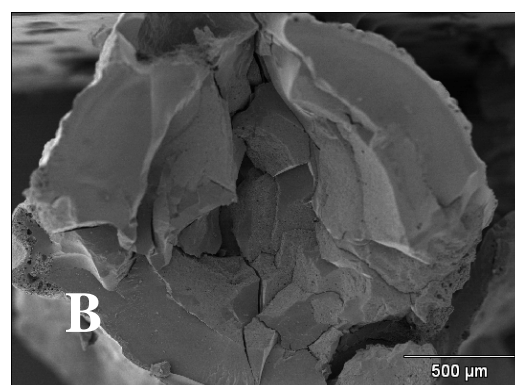
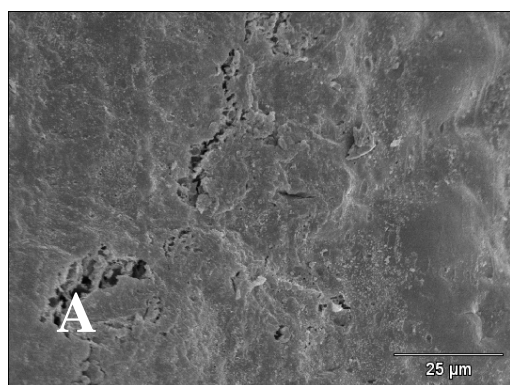


Figura 4.9: Fotomicrografia Eletrônica de Varredura de Blenda de PLDLA/PCL após 220 dias de degradação em diferentes composições. A e B (100/0), C e D (90/10), E e F (80/20), G e H (70/30).

4.4. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).

Análise de GPC fornece dados relativos à massa molar média das blendas de PLDLA/PCL (100/0, 90/10, 80/20 e 70/30) antes e após a degradação em tampão fosfato. Os dados obtidos são apresentados na (tabela. 4.2).

Analisando mais detalhadamente a tabela 4.2, e considerando os valores de Mw, no tempo zero de degradação, pode-se calcular a porcentagem relativa da variação da massa molar das amostras em função do tempo de degradação. Durante o período de 180 dias, a variação de Mw e Mn nas blendas variou significativamente, não sendo observado diferença na porcentagem relativa entre as blendas após esse período. No entanto, se considerarmos os primeiros 30 e 60 dias de degradação, verifica-se uma menor perda de massa molar para a blenda 70/30 (14% em 30 dias e 20% em 60 dias) em relação às blendas 100/0, 90/10 e 80/20 (32%, 37% e 30% em 30 dias e 41%, 38% e 41% em 60 dias, respectivamente).

Apesar da pouca quantidade de PCL nas amostras, no caso da blenda 70/30 (PLDLA/PCL), os valores de Mw mostram que a presença de PCL deixa as amostras mais estáveis à degradação em tampão fosfato até o período de 60 dias.

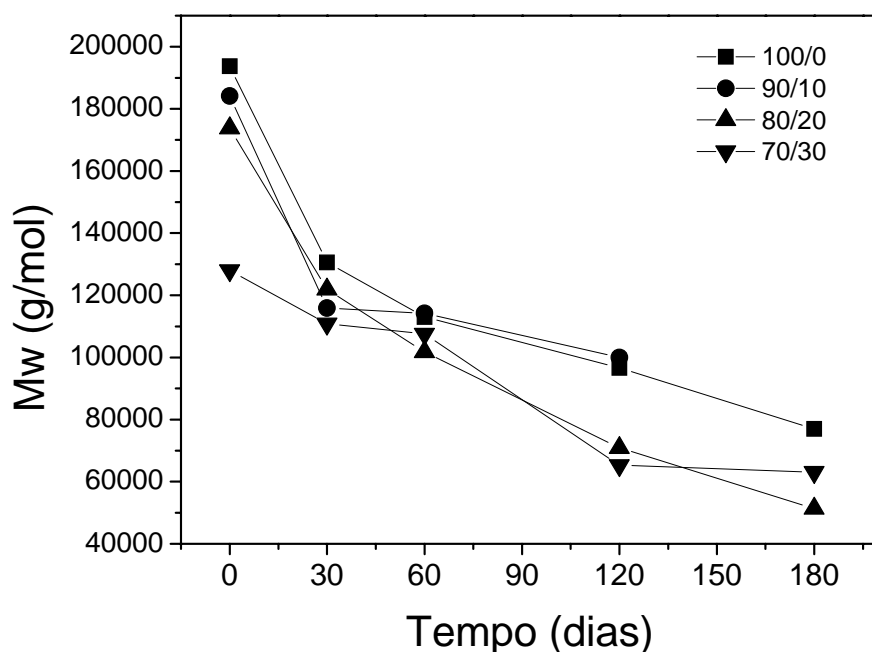


Figura 4.9.1: Massa Molar das blends PLDLA/PCL (100/0, 90/10, 80/20 e 70/30) durante o período de degradação.

Na figura 4.9.1 podemos observar a perda de massa molar das amostras, sendo evidente que até o período de 30 dias elas apresentam uma queda após o período de 60 dias elas tendem a manter a massa molar. Após esse período podemos observar um declínio acentuado na curva da massa molar para todas as amostras, indicando que no intervalo de 180 dias, todas as amostras degradam perdendo suas massas molares significativamente.

De maneira geral, tanto a massa molar ponderal média (M_w) como a massa molar numérica (M_n) são os parâmetros mais sensíveis para o estudo da degradação *in vitro* dessa classe de polímeros bioreabsorvíveis (LEMMOUCHI *et al.*, 1998).

O perfil de queda de massa molar apresentado pelo copolímero PLDLA e suas blends com a adição de PCL foram compatíveis com estudos realizados por pesquisadores em que foi verificado o comportamento de queda de massa molar em função do tempo de degradação para vários materiais poliméricos (LEMMOUCHI ,1998; JEON, *et al*, 2007.; TODO, *et al*, 2007)

O mecanismo de degradação tem sido avaliado nos últimos anos e demonstra ser heterogêneo. A presença de terminais ácidos catalisa a reação de degradação. Inicialmente, o processo é homogêneo, gerando oligômeros solúveis em água em toda extensão do material. Os produtos presentes na superfície da matriz são difundidos para o meio, entretanto, a baixa taxa de difusão dos produtos da reação no interior do material gera um acúmulo de ácidos, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada no centro (DIMITRIOS, *et al*, 2007).

Tabela 4.2: Valores da cromatografia de permeação em gel (GPC) das blendas de PLDLA/PCL em função do tempo de degradação em tampão fosfato.

PLDL/PCL											
Dias	100/0			90/10			80/20			70/30	
	Mw(Da)	Mn(Da)	I.P	Mw(Da)	Mn(Da)	I.P	Mw(Da)	Mn(Da)	I.P	Mw(Da)	Mn(Da)
0	193736	91362	1.9	184199	97629	2.0	173805	62071	1.7	127966	55028
30	130537	74058	1.6	115842	35412	2.0	121933	80435	1.5	110808	47721
60	113032	69932	1.6	114149	64195	1.7	101780	55533	1.8	107634	43228
120	96652	71416	1.3	99980	80538	1.2	70844	41393	1.7	65256	28723
180	76954	48866	1.5	-	-	-	51374	19396	2.6	63097	26737

(Mw): Massa molar média em peso;

(Mn): Massa molar em número ;

(I.P): Índice de polidispersibilidade (Mw/Mn).

4.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

As figuras (4.9.3), (4.9.4), (4.9.5) E (4.9.6) mostram, respectivamente, as curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL nas composições 100/0, 90/10, 80/20 e 70/30 em função do tempo de degradação. Conforme descrito na parte experimental, as amostras foram submetidas a dois aquecimentos com o intuito de verificarmos a temperatura de transição vítrea da PCL, a qual pode ser verificada na figura 4.9.2 para a PCL pura.

A figura 4.9.3, mostra as curvas de DSC para a blenda PLDLA/PCL 100/0, onde se verifica apenas a temperatura de transição vítrea, na região de 55 °C, caracterizando o PLDLA como um material amorfo.

Com a adição da poli(caprolactona) na blenda, figuras (4.9.4), (4.9.5) e (4.9.6) para as blendas PLDLA/PCL 90/10, 80/20 e 70/30 no primeiro aquecimento, respectivamente, verifica-se na região da Tg do PLDLA, um pico referente à fusão do PCL, os quais coincidem. Verifica-se também que à medida que aumenta a composição do PCL na blenda esse pico é mais definido e volta na linha base quando finaliza o processo. A temperatura de transição vítrea da poli(caprolactona) é na região de -50°C, mas não pode ser verificada em função da pequena composição da PCL na blenda, mesmo a blenda contendo 30 % de PCL. No entanto, através da figura 4.9.2, referente à PCL pura, verifica-se a Tg na região de -50 °C. A tabela 4.3 apresenta os dados referentes aos valores de Tg para as blendas e verifica-se que até 120 dias de degradação, as amostras, apesar de se apresentarem opacas e esbranquiçadas não mostram sinais de degradação pelas análises de DSC.

A blenda 100/0, figura 4.9.3, apesar de apresentar Tg invariável até 180 dias, apresenta-se completamente degradada após 220 dias, com diminuição da Tg.

Sample: PCLpino
Size: 9.9000 mg
Method: LB Paula
Comment: Amostra Samuel

DSC

File: C:\...\\USER\\Marcelo\\PCLpino
Operator: Carolina
Run Date: 4-Dec-02 15:09

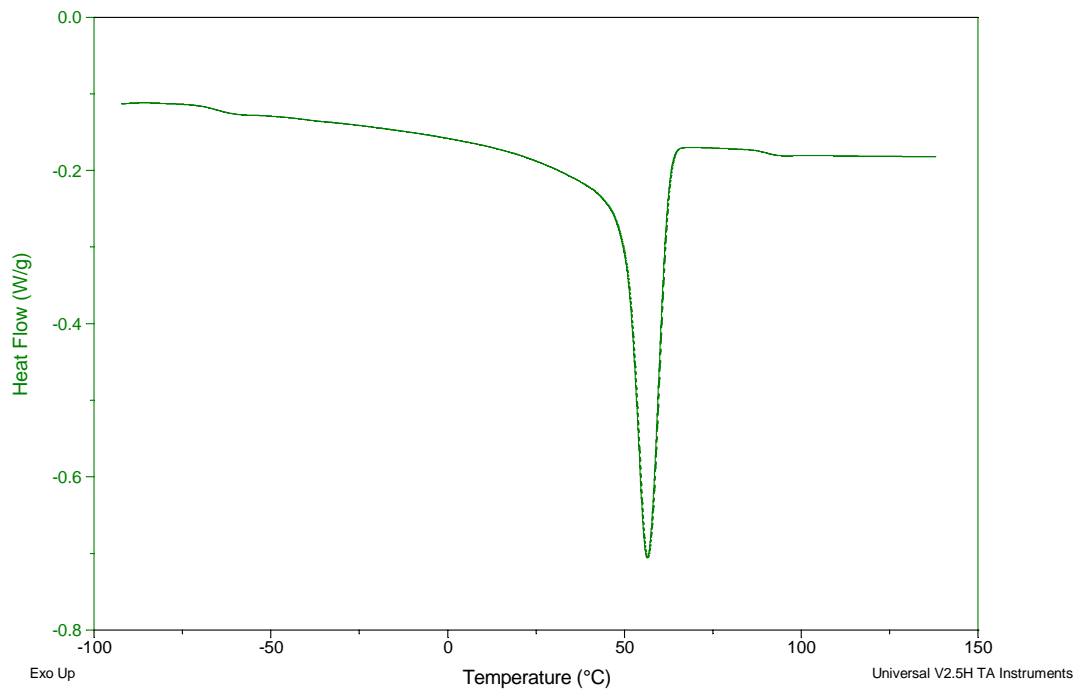


Figura 4.9.2: Curva de DSC da poli(ϵ -caprolactona) pura.

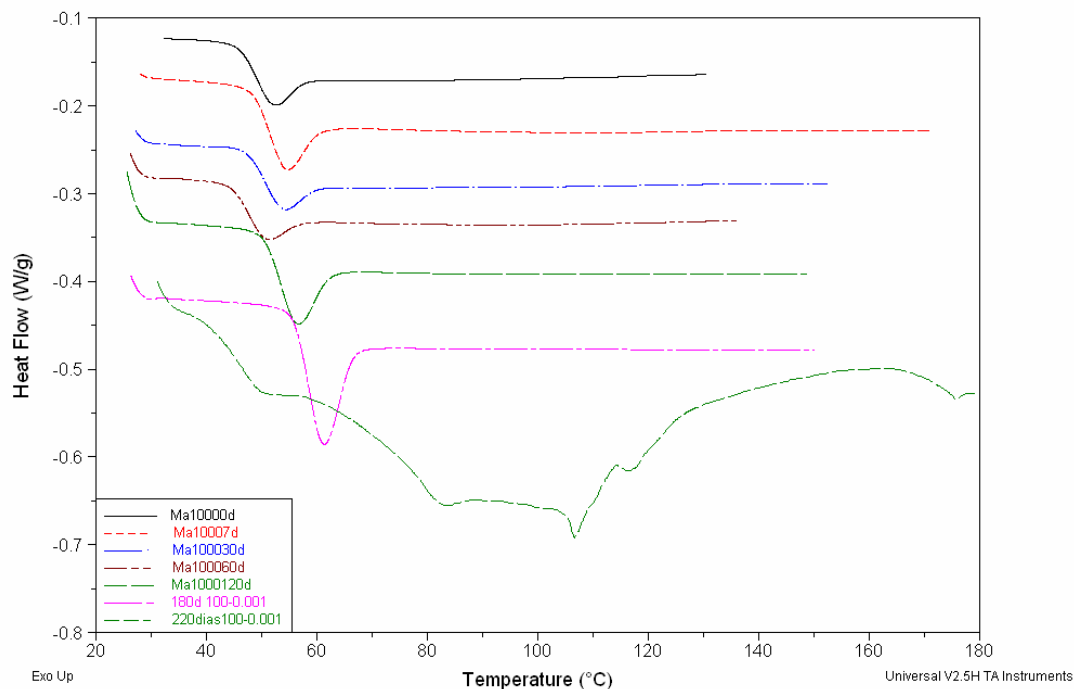


Figura 4.9.3: Curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL 100/0 após 0, 7, 30, 60, 120, 180 e 220 dias de degradação.

Por outro lado, a blenda 90/10, figura 4.9.4, após de 30 dias em tampão fosfato, verificou-se um alargamento na transição referente à Tg, indicando que a Tg do PLDLA está diminuindo, separando-se do pico de fusão da PCL. Essa separação é verificada até 180 dias, sendo que após esse período, verifica-se uma única transição na região de Tg. A partir de 180 dias, verifica-se um pico endotérmico largo na região de 120°C, sugerindo a formação de novos cristais nessa região a medida que a degradação ocorre.

Esse pico endotérmico é evidente após 220 dias de degradação, indicando a formação de cristais de PLDLA em função da degradação. Nas amostras das blendas 80/20, figura 4.9.5, verifica-se o mesmo comportamento, mas o aparecimento do pico de fusão após 180 dias é menos nítido, sendo que o mesmo se intensifica após 220 dias.

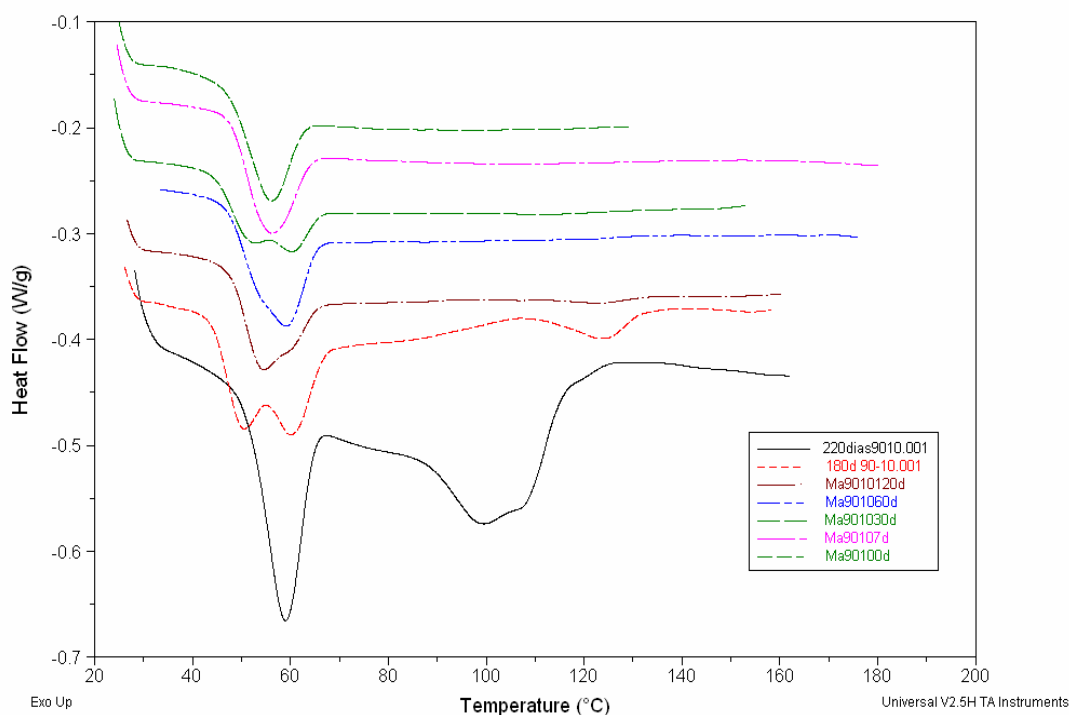


Figura 4.9.4: Curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL 90/10 após 0, 7, 30, 60, 120, 180 e 220 dias de degradação.

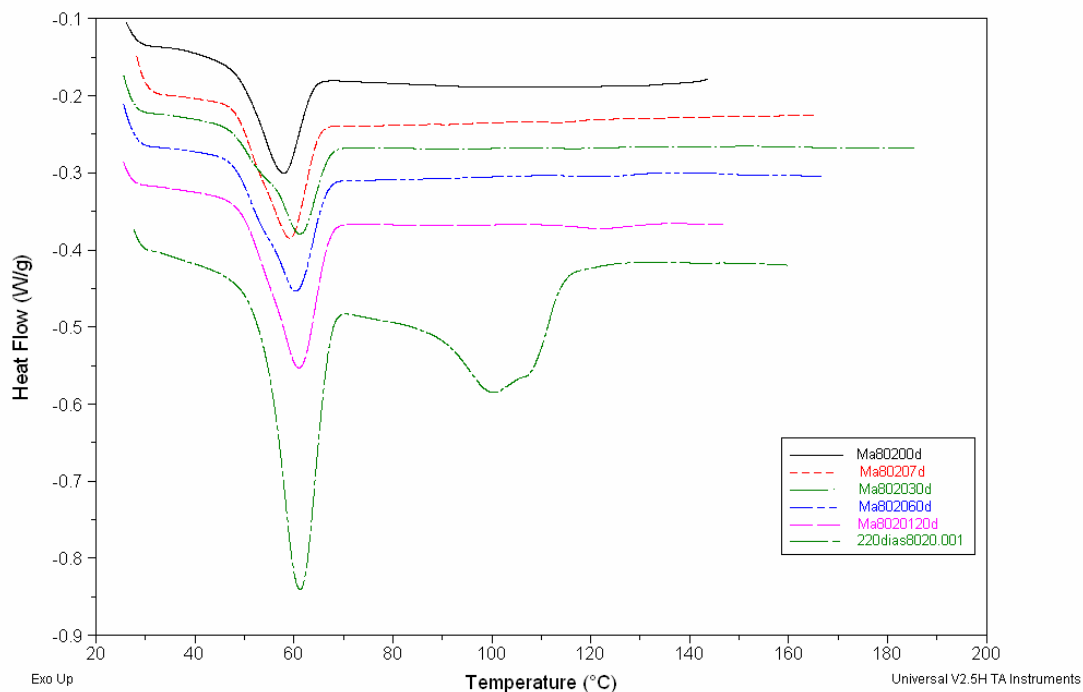


Figura 4.9.5 : Curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL 80/20 após 0, 7, 30, 60, 120, 180 e 220 dias de de degradação.

Nas blendas 70/30, figura 4.9.6, verifica-se que esse comportamento é retardado, com aparecimento do pico endotérmico apenas após 220 dias. Fica evidente que a adição do PCL retarda a degradação das blendas.

Os valores das T_g , obtidas a partir do segundo aquecimento para todas as blendas são mostradas na tabela 4.3. Conforme comentado acima, esses valores reforçam que o aumento da composição da PCL retarda o processo de degradação da blenda.

A figura 4.9.7 resume o comportamento das blendas após 220 dias de degradação, evidenciando claramente a influência do PCL nas diferentes composições de PLDLA.

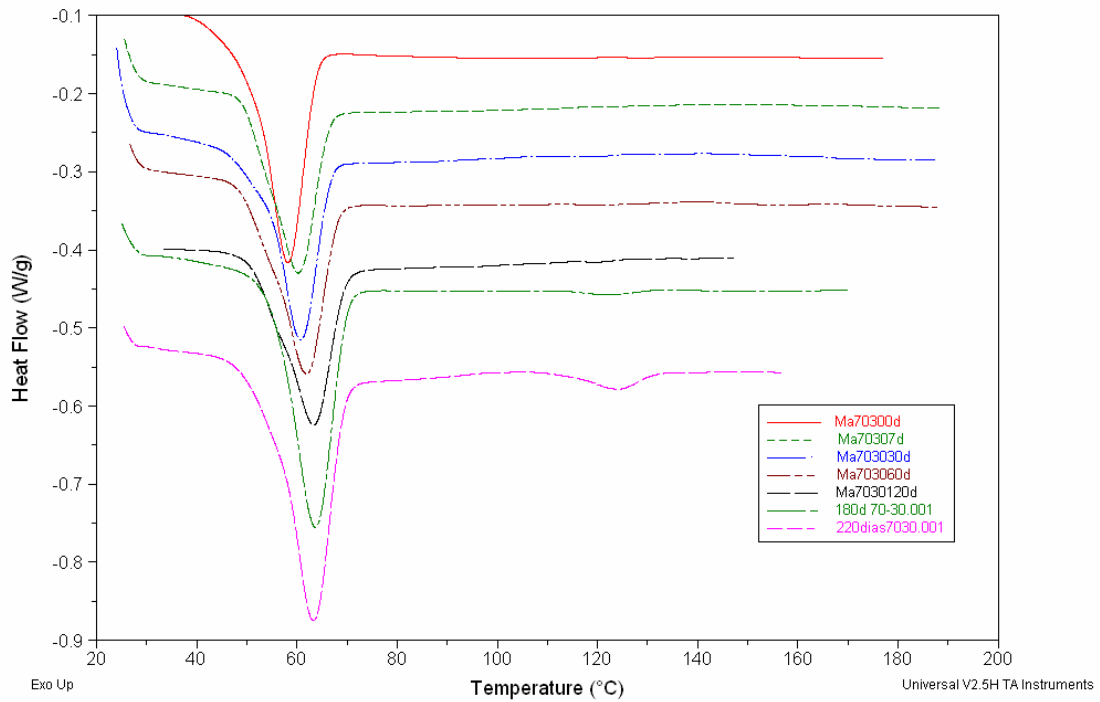


Figura 4.9.6: Curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL 70/30 após 0, 7, 30, 60, 120, 180 e 220 dias de degradação.

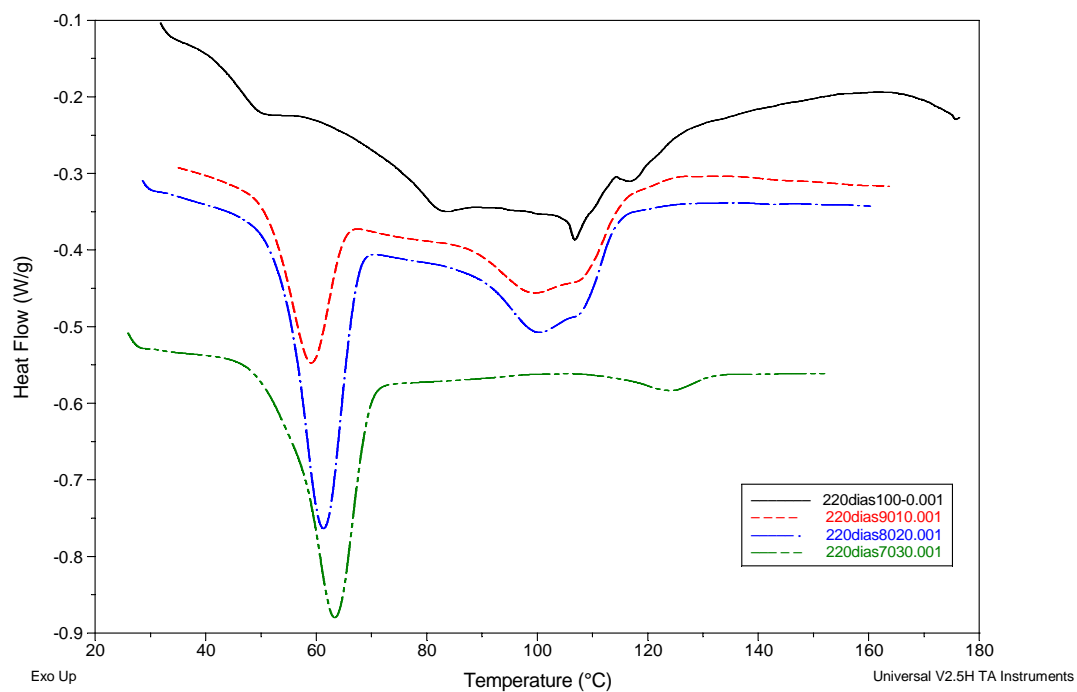


Figura 4.9.7: Curvas de DSC para as blendas PLDLA/PCL 100/0, 90/10, 80/20 e 70/30 após 220 dias de degradação.

Tabela 4.3: Dados de temperatura de transição vítrea, T_g (°C) do PLDLA nas blendas de PLDLA/PCL em função do tempo de degradação, a partir do segundo aquecimento.

PLDLA/PCL				
	100/0	90/10	80/20	70/30
Tempo de degradação (dias)	T_g (°C) PLDLA	T_g (°C) PLDLA	T_g (°C) PLDLA	T_g (°C) PLDLA
0	55	57	56	56
7	55	52	57	56
30	54	53	55	56
60	54	52	50	56
120	54	49	50	53
180	53	49	48	52
220	41	45	42	50

O MDSC nos dá informações sobre o fluxo de calor total, fluxo de calor reversível e fluxo de calor irreversível, sendo possível, desta forma, observar eventos que poderiam estar sendo mascarados caso utilizássemos a técnica de DSC convencional. A T_g , por exemplo, é uma transição reversível que aparece nas curvas de fluxo de calor total e calor reversível, mas não

aparece na curva de fluxo de calor irreversível. Como o sinal da T_g é mais nítido nas curvas de fluxo de calor reversível, as temperaturas de transição vítrea são determinadas através destas curvas (READING, *et al*, 1994).

A figura 4.9.8 mostra a curva de fluxo de calor reversível para a blenda PLDLA/PCL 70/30 antes da degradação, durante o primeiro aquecimento e o resfriamento. Conforme pode ser verificado, esse tratamento permite diferenciarmos a T_g do PLDLA da temperatura de fusão (T_f) da PCL.

Verifica-se também um pico de cristalização no resfriamento, confirmando a cristalinidade da PCL.

O tratamento dos dados através do fluxo de calor não reversível estão na tabela 4.4, onde são mostrados valores da temperatura de fusão (T_f) da PCL nas diferentes composições da blenda. Verifica-se nitidamente que não houve nenhum indício de degradação através dessa análise.

Tabela 4.4: Dados de temperatura de fusão (T_f) da PCL na blendas de PLDLA/PCL a partir do fluxo de calor não reversível

Dias	90/10		80/20		70/30	
	T_f (°C)		T_f (°C)		T_f (°C)	
0	55		56		56	
7	56		55		55	
30	56		55		55	
60	55		55		55	
120	54		56		56	
180	52		54		55	
220	48		48		53	

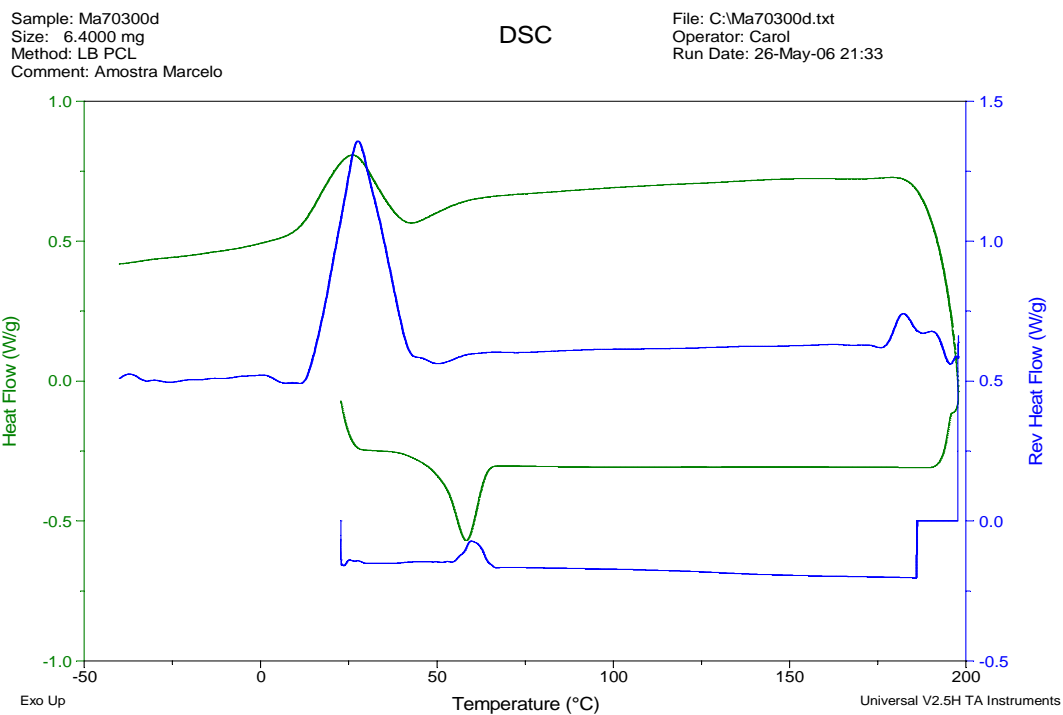


Figura 4.9.8: Curvas de DSC para as blends PLDLA 70/30 antes da degradação.

A degradação dos poliésteres alifáticos tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, foi investigada por muitos autores. A degradação do PLA e PGA foi revisada por KOPECEK & ULBRITH (1983), HOLLAND & YASIN (1986) e LEWIS (1990). A degradação da PCL foi estudada por PITT & SCHINDLER (1983). Sabe-se que a massa molar, polidispersividade, o grau de cristalinidade, a morfologia, a história térmica e a geometria dos polímeros são fatores que influenciam consideravelmente a taxa de degradação (DUMITRIU, 1996). Polímeros com massa molar menores degradam mais rápido que os de massa molar mais alta (LINDHARDT, 1988) e os polímeros ramificados degradam muito mais rápido que os lineares. Entretanto, nenhuma explicação adequada foi dada para este fenômeno (KISSEL, 1991). Contudo, o mecanismo da degradação não está totalmente compreendido. Um estudo mais detalhado sobre a degradação do

PLLA, descrito por VERT, *et al*, (1991), mostra que esse fenômeno ocorre de maneira heterogênea, sendo mais rápido nos domínios amorfos do que nos cristalinos e mais rápido no interior do que na superfície, devido a uma auto-catálise ácida.

O entendimento da degradação preferencial no interior é baseado no estudo *in vitro*, mimetizando o meio fisiológico. O polímero é imerso em um meio aquoso, onde ocorre a absorção de água e inicia-se a clivagem hidrolítica das ligações ésteres, ocasionando uma diminuição na massa molar. No início, a degradação é mais rápida na superfície do que no centro, devido ao gradiente de absorção de água. Os produtos da degradação são formados tanto na superfície quanto no centro, mas aqueles localizados perto da superfície dissolvem-se mais facilmente no meio, pois os localizados no interior devem difundir-se através da massa. Logo, a concentração de grupamentos carboxílicos ácidos aumenta muito mais no interior do que na superfície, catalisando a degradação (PITT & SCHINDLER, 1980).

WOODWARD, *et al*, 1985, ao estudar a degradação do PCL, propuseram que esta ocorre em dois estágios. O primeiro envolve a hidrólise não enzimática das ligações ésteres, autocatalisada pelos grupos carboxílicos terminais dos polímeros, e no segundo estágio o polímero adquire elevada cristalinidade e diminuição da massa molar. O aumento da cristalinidade com o aumento da degradação pode ser explicado devido a um rearranjo das cadeias menores, geradas pelo próprio processo de degradação com a formação de novos cristais (DUEK, *et al*, 1999). Essa explicação está de acordo com a explicação dada por VERT, *et al*, 1991. Outros autores acreditam que o grau de cristalinidade aumenta, pois a parte amorfa se degrada primeiro, permanecendo uma maior porcentagem da fase cristalina (LEENSLAG, *et al*, 1987).

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS ESTUDOS *IN VIVO*

5.1. Análise Morfológica.

Após 7 dias de implante em todos os animais não houve um processo inflamatório agudo intenso nos achados histológicos. Na cortical óssea lesada pelo processo cirúrgico, pode-se observar processo hemorrágico na qual deu origem a células mesenquimais e uma rede de fibrina formando uma trama de sustentação para as células do tecido conjuntivo, células indiferenciadas e polimorfonucleares necessários no processo do reparo ósseo (Figura 5.1- C).

O processo para colocação do implante promoveu a formação de uma cavidade na região cortical chegando ao canal medular. Os implantes puderam ser observados no interior desta cavidade durante o período experimental avaliado. Houve a formação de uma camada óssea ao redor do implante após 7 dias, tanto nos implantes de PLDLA puro, quanto na blenda PLDLA/PCL (Figura 5.1- A,C e D).

A camada de osso neoformado ao redor do implante era contínua, com espessura uniforme e desorganização das fibras colágenas da matriz. Os osteócitos apresentavam forma arredondada, característico de osso jovem ou neoformado.

Pode se observar que em alguns casos espaços da região de osso neoformado ao redor do implante preenchidos com células da medula óssea (Figura 5.1 –D).

Com a lesão da camada cortical, pode se observar um espessamento do periósteo, com uma camada fibrocelular ao redor do implante. Um início de formação óssea nessa região também pode ser observado. Verificou-se a invasão dessas células do periósteo invadindo a região da falha óssea provocada pelo implante na região da camada cortical, preenchendo com tecido conjuntivo a superfície do polímero, auxiliando no processo de reparo ósseo (Figura 5.1-B).

No período de 7 dias após o implante não observamos diferenças significativas entre os implantes de polímero puro de PLDLA e a blenda PLDLA/PCL.

Após 15 dias de implante a camada óssea formada ao redor dos polímeros, tanto no PLDLA puro como na blenda PLDLA/PCL apresentava aspecto semelhante, com formação a partir da camada cortical. Essa camada neoformada apresentou-se espessa e iniciando um processo de organização, evidente pela organização de suas fibras colágenas e diminuição do volume de suas células (Figura 5.2- A-B).

Houve formação de trabéculas a partir do endósteo da camada cortical junto ao polímero, nos dois grupos. Nestas trabéculas neoformadas foram observadas células do tipo osteócitos e osteoblastos (Figura 5.2-A, C). Pode se observar uma linha cimentante separando o osso maduro do osso em formação (Figura 5.2-C).

Em um dos animais, não houve formação óssea lateralmente ao implante, sendo observada uma pequena formação apenas em sua base (Figura 5.2-B). O osso formado ao redor dos implantes, em todos os animais, apresentavam desorganização das fibras colágenas da matriz e os osteócitos apresentavam forma arredondada, caracterizando osso primário (Figura 5.2- A,C).

A reação periosteal junto aos implantes de PLDLA foi mais intensa no período de 15 dias (Figura 5.2-B). Na área oposta a falha o periósteo mostrou-se inalterado para os dois tipos de materiais.

A camada de osso formado ao redor do implante apresentou ainda, local de descontinuidade, onde os espaços criados estavam preenchidos por células fusiformes e células da medula óssea (Figura 5.2-C).

Não foi observada presença de células de infiltrado inflamatório em nenhum dos animais avaliados.

Após 30 dias de implante do PLDLA puro e da blenda PLDLA/PCL, não foi observado infiltrado inflamatório aguda ou crônica. A camada óssea ao redor do implante era mais espessa quando comparadas com tempos anteriores.

No polímero puro de PLDLA, pode se observar a separação da camada cortical e do osso formado pela reação periosteal através de uma linha cimentante. O osso neoformado nessa região encontra-se espesso e com uma organização óssea aparente, com células do tipo fusiformes e osteócitos (Figura 5.3-A).

Nesse período pôde se observar maturação mais evidente do osso neoformado ao redor dos materiais, diferenciando as regiões de osso maduro com as regiões de osso jovem em organização (Figura 5.3- B,D).

Após 30 dias a região da cortical adjacente ao implante estava parcialmente preenchida por tecido ósseo, além de tecido conjuntivo, osteoblastos, osteócitos e vasos sanguíneos em todos os implantes (Figura 5.3-B,C).

A formação óssea ao redor do implante em todos os materiais eram contínuos com as trabéculas do canal medular com a cortical próximos ao local da falha. A espessura desta camada óssea era uniforme ao longo da superfície do implante.

Até o período de 30 dias, não se observou diferença histológica significativas entre o polímero puro de PLDLA e da blenda de PLDLA/PCL.

Após 80 dias de implante do PLDLA e da blenda PLDLA/PCL (70/30), nos estudos *in vivo*, os dois materiais apresentaram reações histológicas muito semelhantes. Nesse período o polímero não havia sido degradado, permanecendo no local do implante. Houve uma discreta reação periosteal na região do implante ao redor do material tanto no material puro quanto na blenda (Figura 5.4-A, C). Pode ser observada uma reação endosteal a partir da camada cortical envolvendo o material de onde provem as células osteoprogenitoras que deram origem ao osso neoformado. Os dois materiais apresentaram uma cápsula de tecido ósseo ao seu redor, apresentando áreas de osso maduro e áreas de osso imaturo separados por uma linha cimentante (Figura 5.4-B, D). Não houve presença de tecido mole entre os polímeros implantados e o osso formado ao redor do material.

Podemos destacar nesse período de 80 dias após implante uma camada de tecido ósseo com áreas de padrões lamelados e áreas de osso jovem com presença de osteóides, característicos de osso não mineralizado (Figura 5.4-B,D).

Pode se observado na blenda uma continuidade da camada cortical com a camada óssea que envolve o material implantado. Áreas com osteoblastos recém aprisionados e áreas de lamelações também foram verificadas (Figura 5.4-D).

Após 120 dias de implante dos materiais implantados não foi observada mudança histológica significativas entre esse período e o período de 80 dias. A camada de tecido ósseo envolvendo os materiais apresenta-se espessa e mista nos dois materiais (Figura 5.5- A, D). A área lamelar envolvendo o PLDLA puro apresentou uma espessura maior que a da blenda, com presença de uma camada delgada de tecido conjuntivo entre o osso e o implante (Figura 5.5- B). Nesse mesmo material pode se observar o processo de formação de osso maduro, com presença de células globosas não aprisionadas por tecido mineralizado. Nesse período os implantes com o polímero de PLDLA revelaram uma processo normal de remodelagem do osso envolvendo o material, um não espessamento do osso já formado e a presença de células mesenquimais osteoprogenitoras provenientes do endosteo (Figura 5.5-B).

Nos implantes com as blendas de PLDLA/PCL, pode se notar, além de uma camada óssea mista ao redor do material, uma neovascularização presente na área do implante. Nessas blendas

foi possível observar tecido ósseo com áreas claras típicas de osso maduro e áreas mais escuras, típicas de osso imaturo (Figura 5.5-C,D).

Até o período de 120 dias após o implante dos dois materiais não houve fendas ou porosidade apresentada pelo material, pois não foram notadas invasões celulares e teciduais nesses materiais, o que seria normal caso isso ocorresse com os materiais.

Após 180 dias de implante dos materiais na tíbia dos ratos pode se observar em PLDLA uma permanência da camada óssea envolvendo o material, porém nesse período podemos notar uma maior quantidade de osso maduro. Presença de uma camada delgada de tecido conjuntivo entre implante e o osso (Figura 5.6-A, B). Essa camada apresenta-se rica em fibras com escassez de células imaturas e presença de vasos sanguíneos. Em todos os achados nesse período houve uma reação normal de maturação óssea.

Nos implantes com a blenda PLDLA/PCL pode se observar uma camada de osso lamelar ao redor do material predominante com relação a região de formação de osso jovem, além de presença de vasos. Até o período de 180 dias de implante da blenda não houve a presença de cápsula fibrosa. Em 180 dias a blenda apresentou um processo de maturação óssea normal com presença de canais de havers e trabeculações (Figura 5.6-C, D).

Figura 5.1

- A.** Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 7 dias de implante. Notar a área do implante (AI) envolvida com o osso neoformado (seta), Medula óssea (MO) e camada cortical (CC). Resina Glicol Metacrilato, Azul de Toluidina. 100X.
- B.** Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 7 dias de implante. Observar a Camada Cortical (CC), próxima a área do implante (AI). Intensa reação periosteal (RP) onde também pode ser observado áreas de neoformação óssea (*). Resina Glicol Metacrilato, Azul de Toluidina. 200X.
- C.** Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 7 dias de implante. Observar o osso neoformado (ON) entre a camada cortical (CC) e a medula ossea(MO). Observa-se áreas com discreto infiltrado inflamatório (seta) junto ao implante (AI). Resina Glicol Metacrilato, Azul de Toluidina, 200X.
- D.** Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 7 dias de implante. Notar áreas de formação óssea com osteóide e osteoblastos (seta) ao redor da região do implante (AI) e a camada cortical (CC). Resina glicol metacrilato. Azul de toluidina, 200X.

Figura 5.1

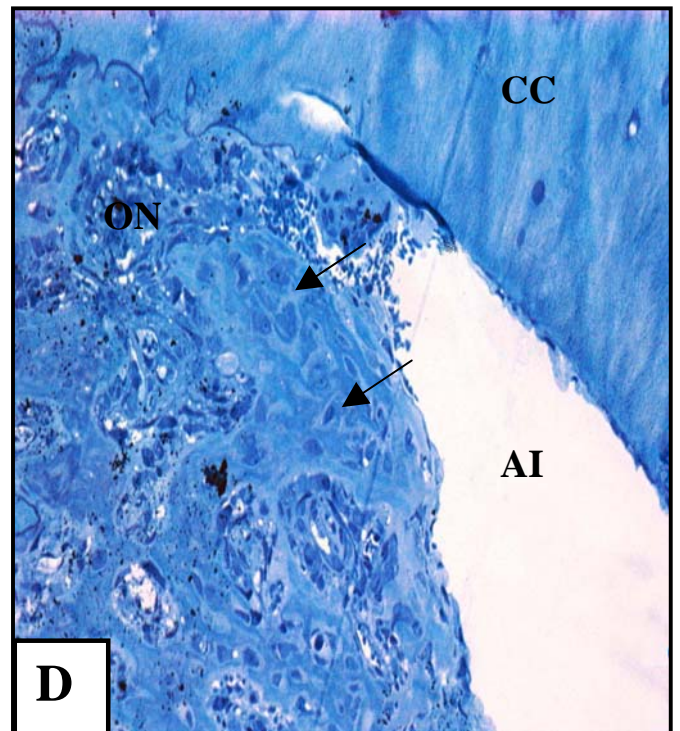
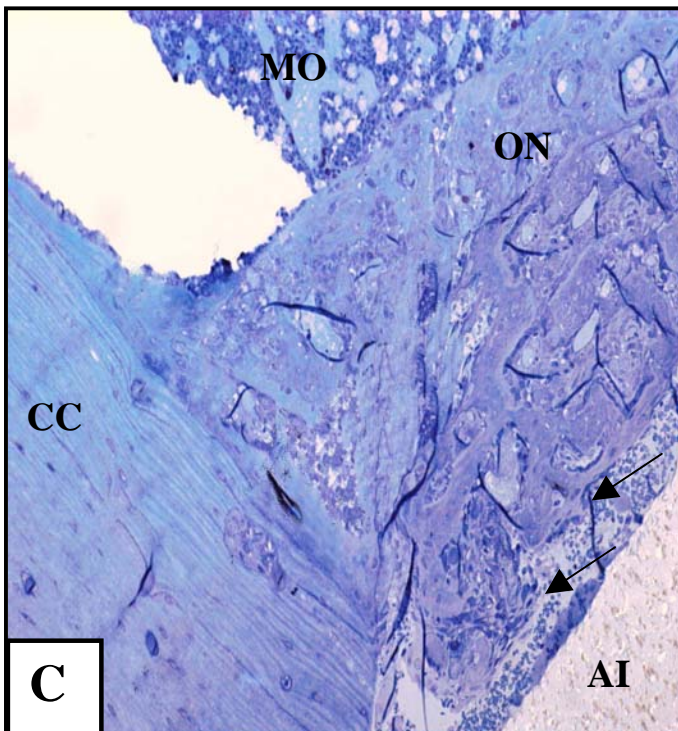
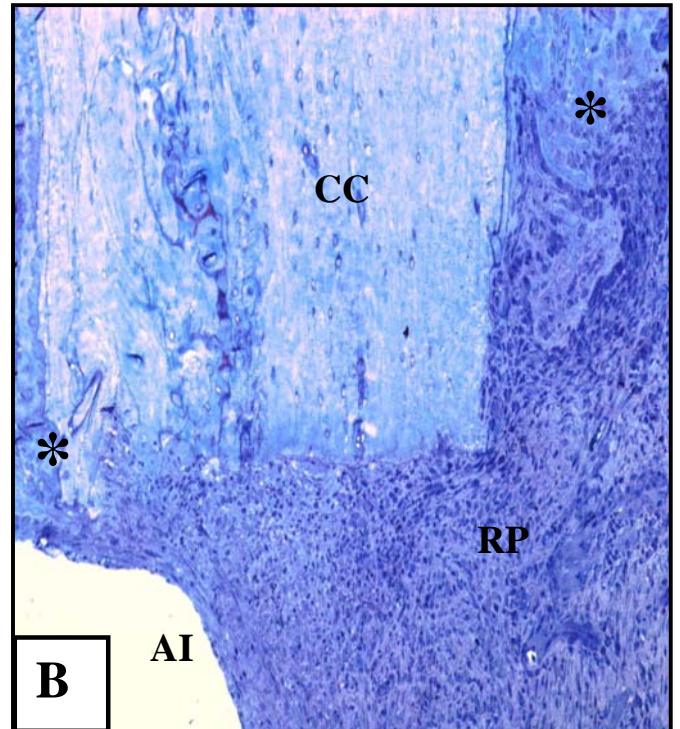
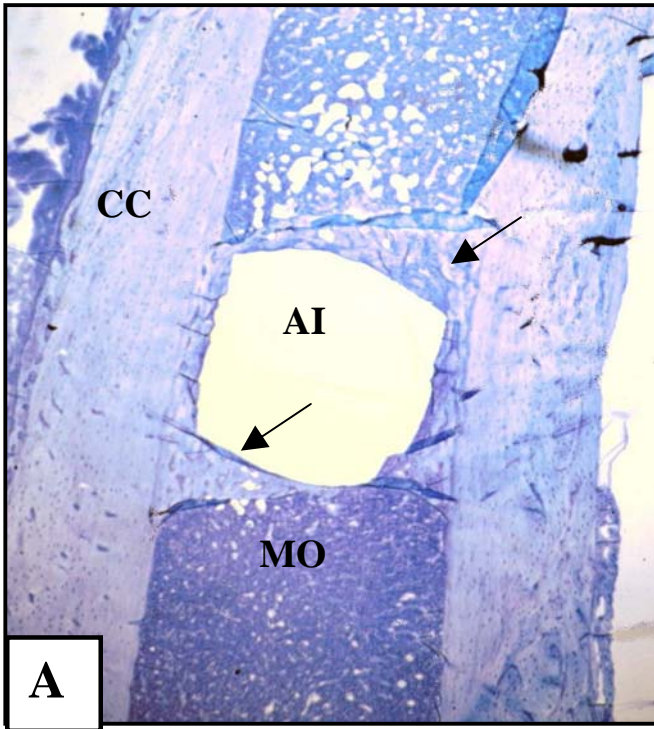


Figura 5.2

- E.** Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 15 dias de implante. Notar osteoblastos (seta) junto à área do implante (AI). Observar uma camada de osso neoformado (ON). Resina Glicol Metacrilato, Azul de Toluidina. 200X.
- F.** Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 15 dias de implante. Observar a falha ossea na região cortical (CC) realizada para a colocação do implante (AI), com neoformação óssea em sua base (seta) e próximo a medula óssea (MO). Resina Glicol Metacrilato, Azul de Toluidina. 100X.
- G.** Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 15 dias de implante. Note a neoformação óssea (seta) ao redor do implante (AI) em contato com a medula óssea (MO). Resina Glicol Metacrilato, Azul de Toluidina, 200X.
- H.** Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 15 dias de implante. Notar a formação óssea (seta) ao redor do implante (AI) em contato com a medula óssea (MO) e a camada cortical (CC). Resina glicol metacrilato. Azul de toluidina, 200X.

Figura 5.2

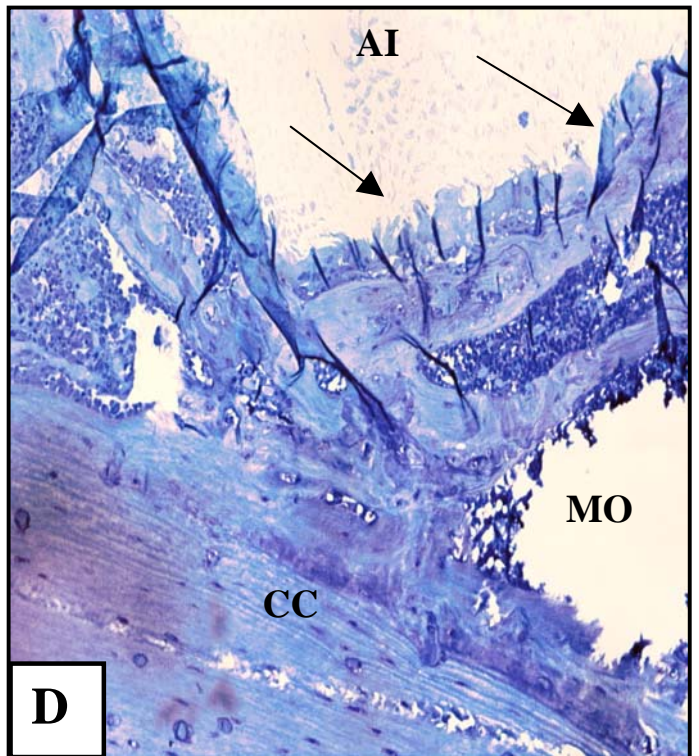
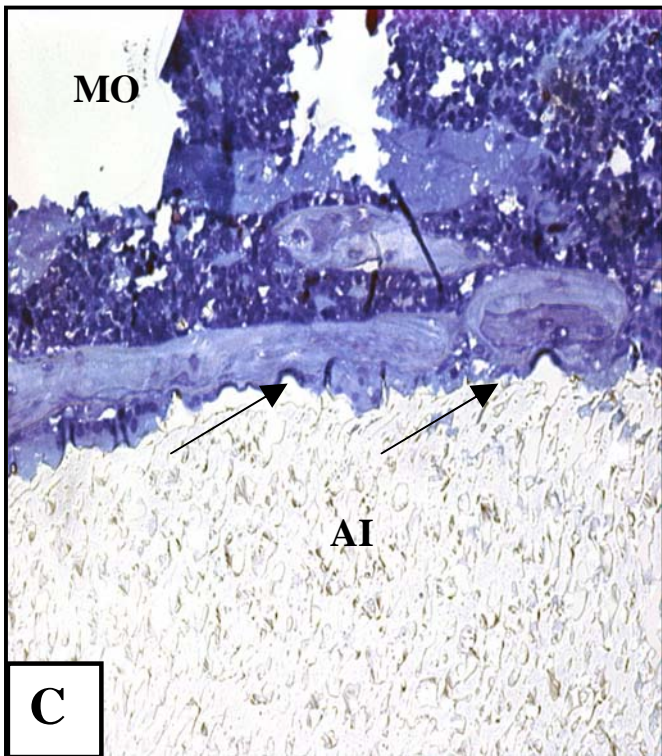
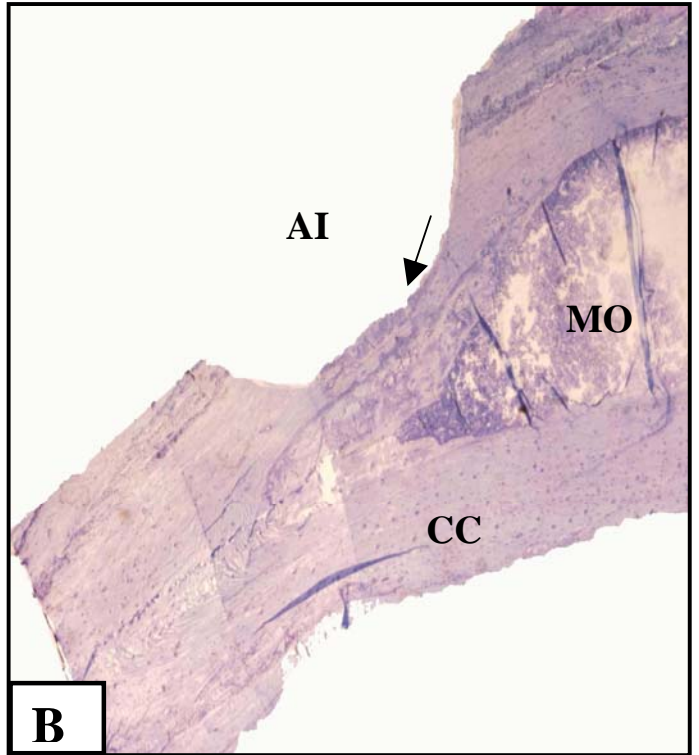
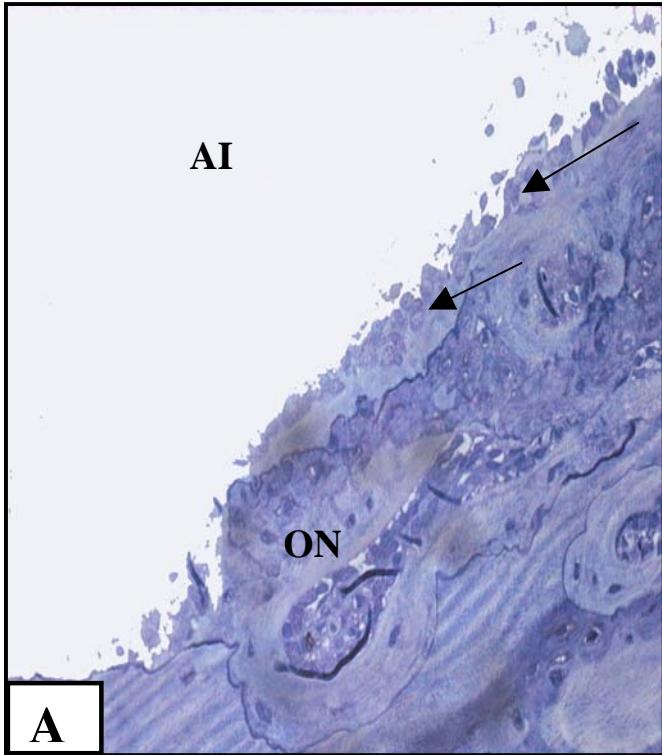


Figura 5.3

- A. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 30 dias de implante. Notar a formação óssea (ON) em contato com a camada cortical (CC) sendo separada desta pela linha cimentante (seta). Resina Glicol Metacrilato, Azul de Toluidina. 200X.

- B. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 30 dias de implante. Observar a neoformação óssea (sera) ao redor da área do implante (AI). Camada cortical pré-existente adjacente ao osso neoformado mostrando lamelação característica de osso maduro. Resina Glicol Metacrilato, Azul de Toluidina. 200X.

- C. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 30 dias de implante. Notar a formação de tecido ósseo neoformado (ON) ao redor do polímero (AI). Resina glicol metacrilato. Azul de toluidina, 200X.

- D. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 30 dias de implante. Podemos observar uma região de osso neoformado (ON) ao redor do implante (AI) e camada ossea cortical (CC). Resina glicol metacrilato. Azul de toluidina, 200X.

Figura 5.3

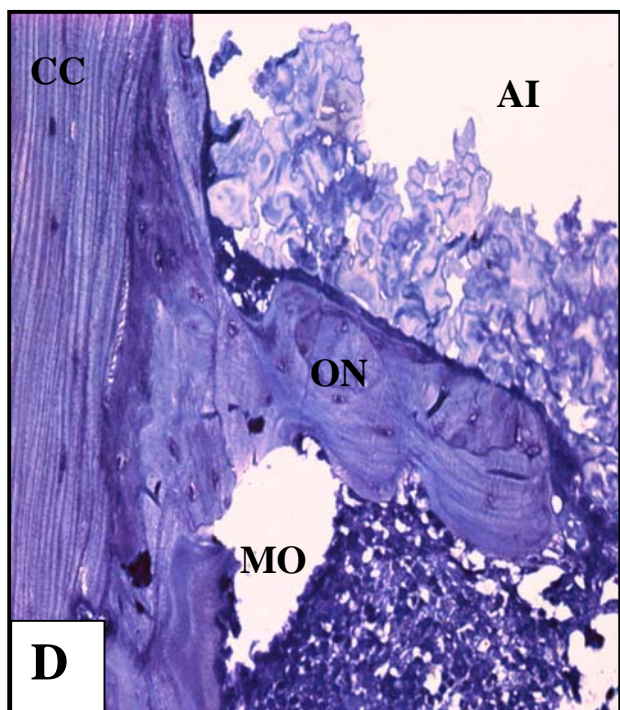
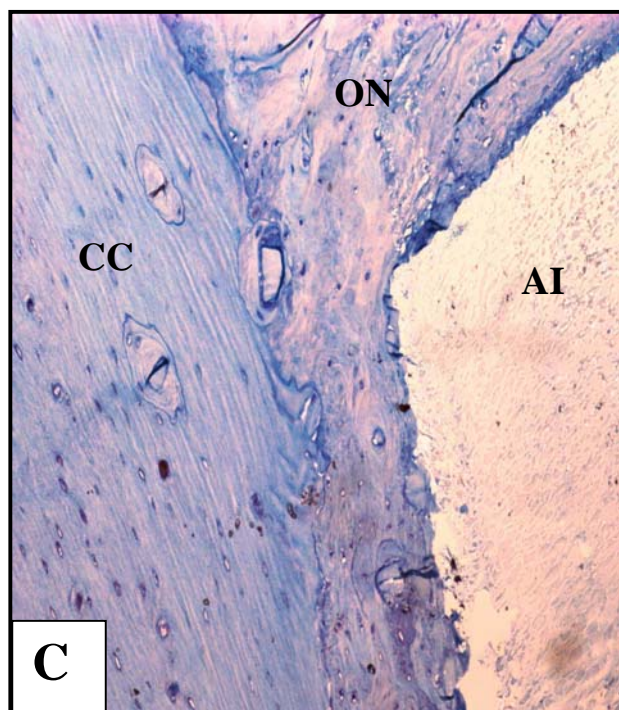
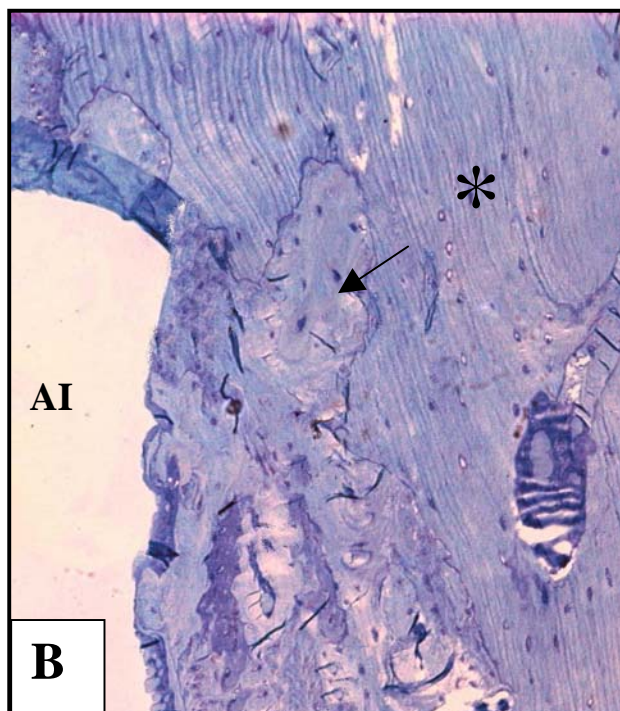
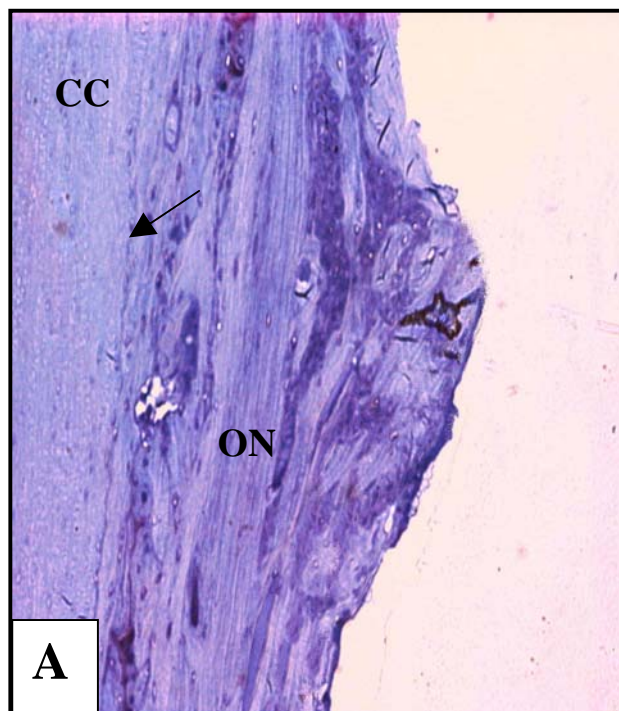


Figura 5.4

- A. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 80 dias de implante. Notar a presença de área do implante (AI) junto ao canal medular (MO), com capsula de tecido ósseo (OM) ao redor. Parafina, H.E. 200X.

- B. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 80 dias de implante. Observar abaixo da camada medular (MO) a formação de uma cápsula de tecido ósseo misto, com osso maduro lamelar (OM) e osso jovem (OJ) e entre eles uma linha cimentante (seta). Parafina, H.E. 400X.

- C. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 80 dias de implante. Podemos observar a camada óssea (seta) ao redor do material implantado (AI). Parafina, H.E. 200X.

- D. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 80 dias de implante. Podemos observar áreas de osso jovem (*) ao redor do implante (AI). Parafina, H.E. 400x.

Figura5.4

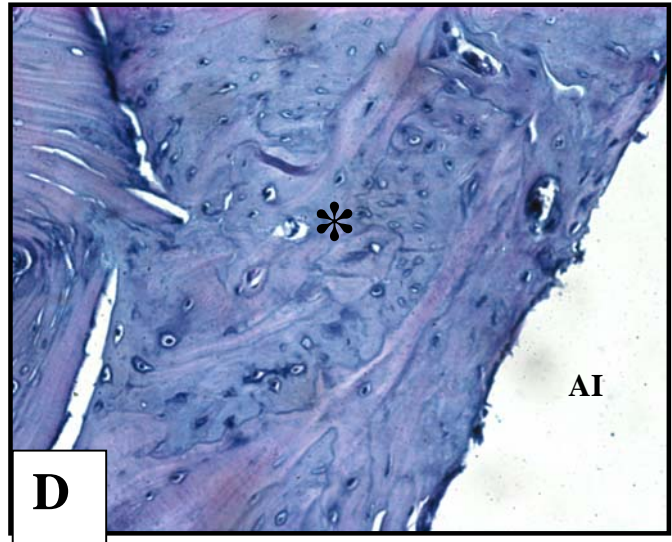
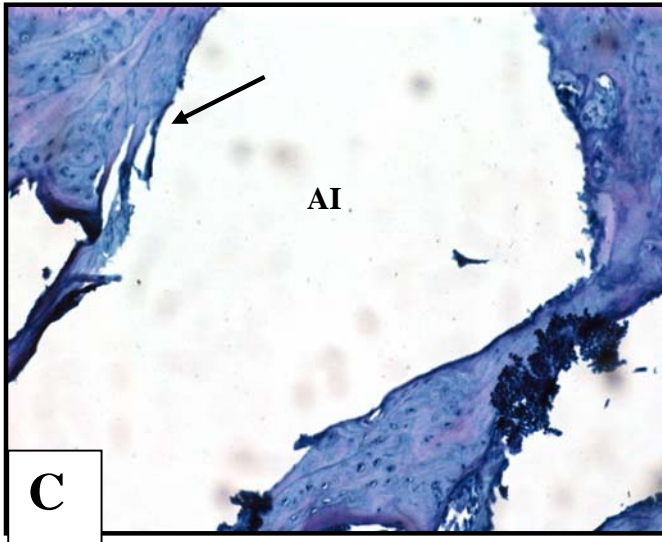
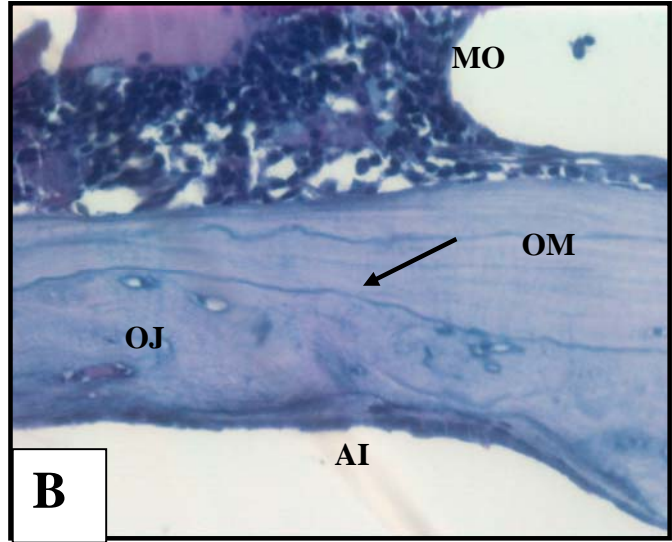
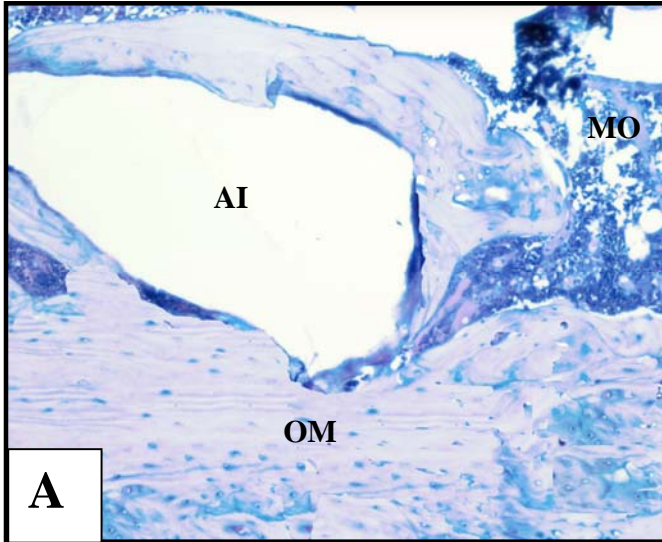


Figura 5.5

- A. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 120 dias de implante. Notar a presença de uma camada de tecido ósseo (*) ao redor do polímero (AI).Parafina, H.E. 200X.

- B. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 120 dias de implante. Observar a presença de células osteoprogenitoras (*), área de osso jovem (ON) junto à área de implante (AI).Parafina. H.E. 400X.

- C. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 120 dias de implante. Notar a área do implante (AI) no canal medular (MO) com cápsula de tecido ósseo ao redor (seta). Parafina. H. E. 100X.

- D. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 120 dias de implante. Podemos observar camada óssea, com presença de osso jovem e osso maduro (ON) formação de capilares sangüíneos (seta), ao redor da área de implante (AI). Parafina, H.E. 400X.

Figura 5.5

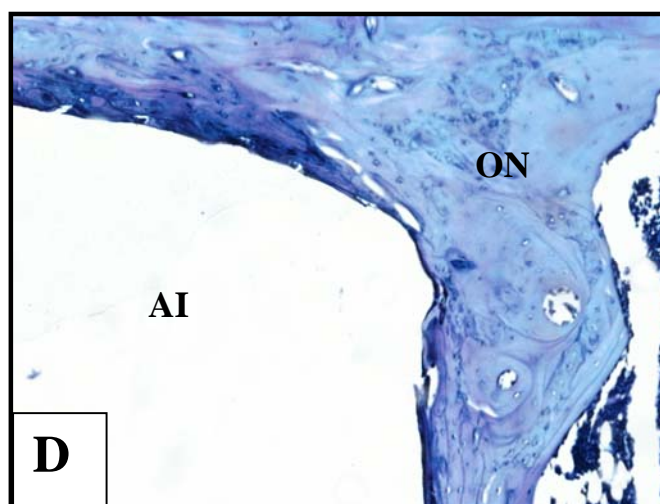
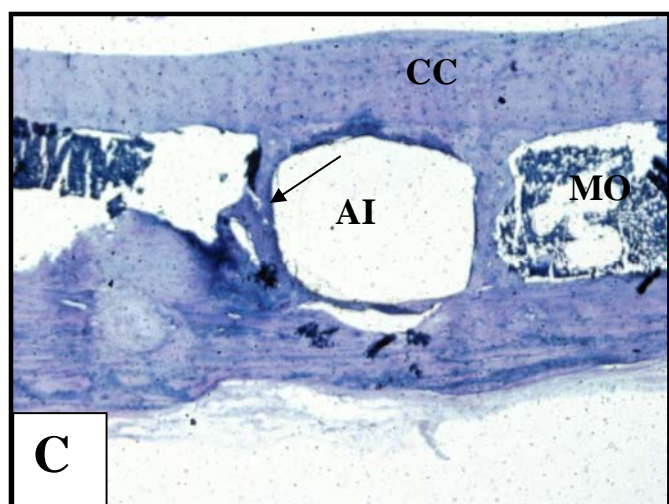
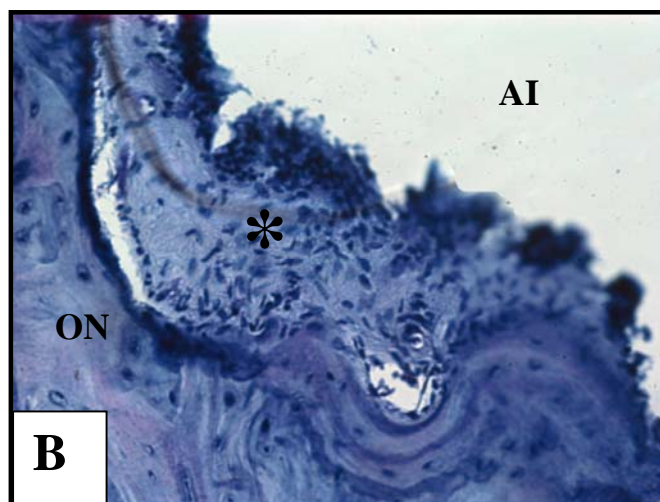
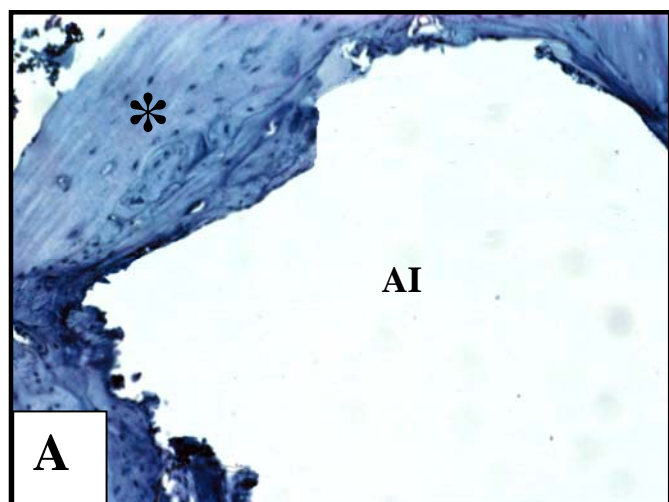


Figura 5.6

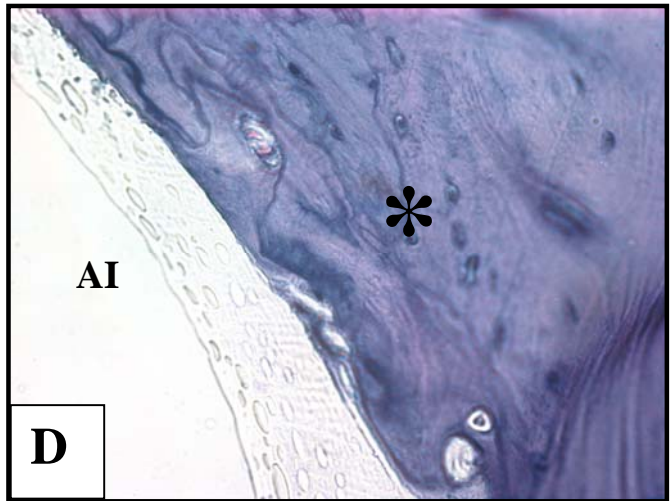
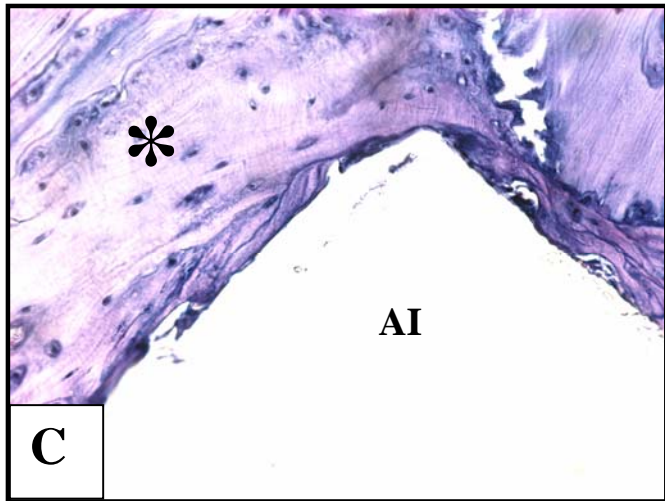
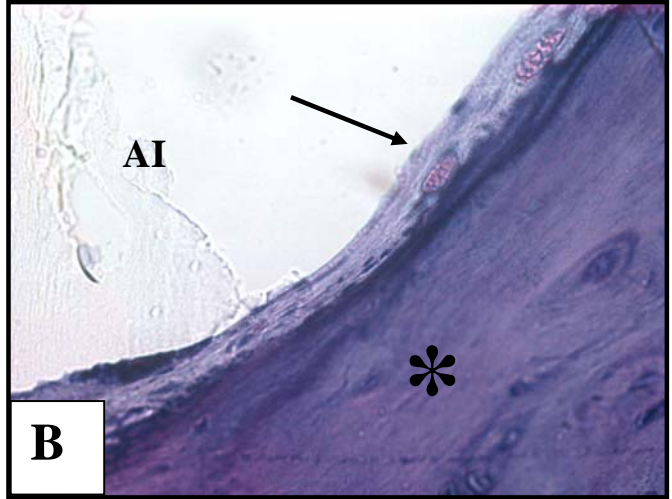
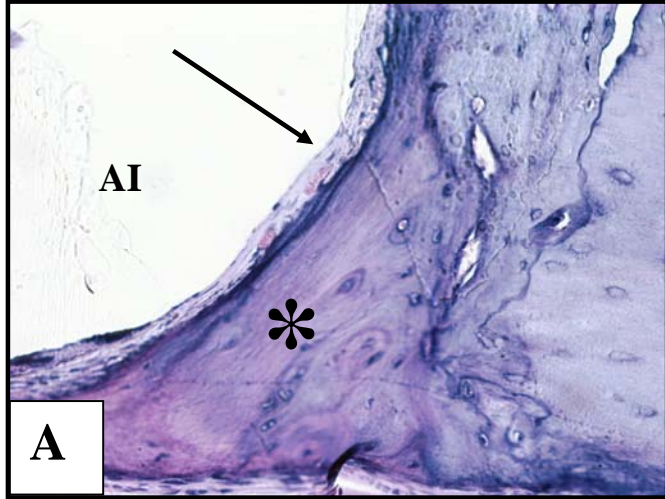
- E. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 180 dias de implante. Notar a presença de uma camada de tecido conjuntivo (seta) entre o polímero (AI) e osso neoformado (*). Parafina, H.E. 400X.

- F. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com PLDLA puro após 180 dias de implante. Observar a camada óssea madura (*) envolvendo o material (AI) e entre osso e implante, cápsula de tecido conjuntivo (seta). Parafina, H.E. 400X.

- G. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 180 dias de implante. Notar o predomínio de osso lamelar (*) junto à área de implante (AI). Parafina, H.E. 400X.

- H. Fotomicrografia de um corte longitudinal da tíbia do rato implantado com a blenda PLDLA/PCL após 180 dias de implante. Podemos observar a camada óssea com áreas de osso lamelar (*) ao redor do material implantado (AI). Parafina, H.E. 400x.

Figura 5.6



5.2. DISCUSSÃO.

A histologia da diáfise tibial é caracterizada por canal medular rico em células mesenquimais, que favorece íntimo contato do material implantado com essas células estimulando a migração e proliferação celular e consequentemente o restabelecimento da continuidade tecidual perdida durante o procedimento cirúrgico (NOJIMA, 2004).

A migração celular estimulada pela propriedade de osteo-condução dos implantes foi constatada em maior grau na interface com a cortical. Como observado por DAVIES, 1998 e JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995, o trauma gerado pelas brocas nesta região criou áreas de necrose e posteriormente a ativação de osteoclastos com a função de destruição do tecido injuriado. Ainda segundo LIMA (2004) e NOJIMA (2004), somente após a remoção do tecido necrótico e formação de tecido de granulação, ocorre a infiltração de células mesenquimais provenientes da cortical interna.

Apesar de inúmeros estudos ilustrarem a ocorrência de efeitos colaterais oriundos da biodegradação de biomateriais, entre eles a formação de granulomas, reações alérgicas e de corpo estranho, assim como a presença de cápsula fibrosa envolvendo o material implantado (HASEGAWA, 2002; BERGSMA, 1993). Nesse experimento os cortes histológicos revelaram ausência de células inflamatórias e reações de corpo estranho na interface osso-implante após o período de 15 dias.

Os resultados histológicos obtidos nessa primeira etapa mostraram reação satisfatória do tecido em relação aos materiais implantados. Não houve processo inflamatório agudo exacerbado nos implantes com o polímero puro de PLDLA. O mesmo ocorreu com a blenda PLDLA/PCL (70/30). Nos dois casos, até o período 7 dias houve a presença de células do tipo polimorfonucleares e uma rede de fibrina formando uma trama de suporte para as células de reparo. A presença deste infiltrado celular representa a primeira linha de defesa de células inflamatórias e são substituídos pelos macrófagos que eventualmente participam do processo final de degradação dos materiais remanescentes (BERGSMA, 1993).

Segundo RIEGGER 1993, a recuperação óssea após o trauma começa com o hematoma que envolve os fragmentos ósseos e os tecidos moles. O hematoma é invadido por uma frouxa malha de capilares e fibroblastos. As células que se proliferam e se diferenciam são nutridas pela extremidade final do periósteo, endosteio e medula óssea. A separação pelo processo cirúrgico do periósteo estimula a proliferação de células no interior do mesmo e uma nova formação óssea começa em 48 horas.

Tanto nos animais de 7 dias após implante cirúrgico dos materiais, quanto após 15 dias, pode-se observar a presença de calo ósseo. O calo, substância formada pela proliferação de células no local do trauma, é composto pela combinação de osso e cartilagem. Com o passar do tempo, este calo deverá ser reabsorvido pelos osteoblastos e a fratura finaliza sua consolidação (RIGGER 1993).

No ciclo regenerativo, a liberação de fatores de crescimento estimula a angiogênese e a formação de capilares favorece a manutenção do pH local pela drenagem dos metabólitos a partir do 21º dia pós-injúria (DAVIES, 2000). Nas análises histológicas dos implantes, ambos materiais observou-se presença de capilares e ossificação medular. Essa infra-estrutura de capilares atua ainda como via de drenagem para os produtos de degradação provenientes do metabolismo anaeróbio na área em regeneração, assim como favorece a migração de células mesenquimais a partir da medula e cortical interna que regulam diretamente a regeneração óssea (DAVIES, 1998; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995). No presente trabalho o crescimento ósseo intramedular a partir de células mesenquimais caracterizou a ossificação intramembranosa, que auxiliou no reparo da lesão

De alto potencial osteogênico e migratório, as células mesenquimais são conduzidas ao longo da matriz extra-celular rica em colágeno até a superfície do implante (LIMA, 2004). O potencial migratório da osteocondução se restringe ao início da síntese protéica quando as células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos, células maduras que compreendem a vanguarda do crescimento ósseo. Diferente do crescimento aposicional onde linhas incrementais demarcam a neo-formação óssea, a formação do osso novo é caracterizada pela atividade de células em diferenciação que delimitam a nova deposição óssea por linhas reversas também conhecida como linha cimentante, característica esta observada no presente trabalho. Essa morfologia decorreu da

migração celular em direção do pino a qual foi precedida pela atividade osteoclástica para demolição do tecido necrótico, logicamente em direção contrária à neo-formação óssea (DAVIES, 2000; KUSUZAKI, *et al.* 2000; TEN CATE, 1994).

Conforme BURG (2000) a proliferação osteoblástica é sensível à superfície topográfica e à estímulos mecânicos. O tamanho da partícula, formato e relevo de superfície afetam a adesão celular, proliferação e fenótipo. Essas características de superfície são particularmente interessantes quando se considera o material bioreabsorvível dinâmico, o qual sempre apresentará uma nova superfície de contato.

Verificou-se até o período de 30 dias de implante a presença de vários vasos sanguíneos de pequeno calibre que emitem capilares em direção ao tecido em formação, caracterizando resposta adequada de regeneração tecidual. De acordo com Burg (2000) as respostas teciduais locais ao polímero *in vivo* dependem de sua biocompatibilidade, assim como de sua degradação em produtos.

BURG (2000) observou também que a degradação dos polímeros bioreabsorvíveis começa desde o contato destes com o tecido *in vivo*.

Ao se utilizar fixação rígida com implantes metálicos, o osso torna-se menos resistente após a consolidação. A fim de se evitar atrofia óssea, têm sido desenvolvidos materiais e implantes de fixação semi-rígidos como os que foram utilizados nesse trabalho. Sendo assim, o implante de fixação ideal perderia sua resistência gradualmente, transferindo assim o estresse mecânico que lhe é inerente, para o foco fraturário. Quando o implante não se faz mais necessário, pode então, ser absorvido pelo tecido (MANNINEM, 1993).

Nos implantes realizados até o período de 30 dias, os polímeros biorabsorvíveis de PLDLA puro e a blenda de PLDLA/PCL (70/30) conseguiram satisfazer várias requisições biológicas e técnicas para serem aceitos de acordo com GOGOLEWSKI (2000). Assim, não induziram reação inflamatória ou reação de corpo estranho, não demonstraram efeito carcinogênico, mutagênico ou não causaram alergias, hipersensibilidade ou toxicidade nem desencadearam reações imunes.

Após 80 dias de implante, foi possível observar a maturação de osso presente ao redor dos implantes de PLDLA E PLDLA/PCL. Esse processo de maturação foi observado também por CORAÇA, 2002, em pinos colocados em tíbias de ratos Wistars. Nesse experimento, CORAÇA observou que o osso presente ao redor do implante estava diferenciando em osso lamelar após dez semanas pós- implante. A presença de osso jovem na camada óssea neoformada ao redor do implante se deve ao processo de remodelagem do osso. A remodelagem óssea é um fenômeno que ocorre em todos os ossos, sendo continua durante toda a vida em resposta a estímulos mecânicos ou orgânicos aos quais são submetidos normalmente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Células fusiformes semelhantes a fibroblastos foram encontradas na interface do implante com o osso neoformado nos animais implantados com o polímero puro de PLDLA após 120 e 180 dias. Uma fina camada de células fusiformes na interface osso/implante também foi observada por MAINIL-VARLET, *et al*, 1997, em implantes ósseos com polímeros de PLLA. Nesse trabalho, uma delgada camada celular esteve presente após o período de um ano nos implantes de PLLA. Segundo os autores, variações da resposta tecidual relacionadas a ausência ou presença de tecido fibroso na interface ou espessura desta camada, podem resultar de diferentes características dos implantes. Implantes que apresentam uma superfície lisa, por exemplo, tendem a formar camadas fibrosas menos espessas quando comparadas a implantes que apresentam microporos ou irregularidades em sua superfície.

A persistência dessa camada fibrosa nos implantes de PLDLA puro até o período de 180 dias está de acordo com a literatura, pois, esse material, em implantes *in vitro*, mostrou pouca degradação da sua superfície até o período de 180 dias, só sendo possível observar uma modificação em sua superfície após o período de 220 dias. O mesmo fato não ocorreu com as blendas de PLDLA/PCL nas quais apresentaram uma superfície irregular em estudos *in vitro* com 120 dias em tampão fosfato. Nos implantes realizados com as blendas, essa camada fibrosa entre osso/implante não foi observada, o que reafirma os achados histológicos por MAINIL-VARLET, *et al*, 1997 permitindo um contato direto do osso com o material.

Com relação a quantidade de osso neoformado junto aos implantes, podemos afirmar que não houveram variações significativas entre as blendas de PLDLA/PCL 100/0 e 70/30.

Polímeros que degradam rapidamente não são de grande interesse em áreas ortopédicas, quando o modelo ósseo a ser implantado são os ossos longos. No processo de degradação in vivo, esses polímeros apresentam fendas por onde as células ósseas vão invadir e formar um tecido ósseo neoformado. Porém ao apresentarem fendas, esses materiais também apresentam perda nas suas propriedades mecânicas o que não é de interesse em implantes em ossos longos, pois o material tem que apresentar biocompatibilidade e resistência às tensões mecânicas provocadas pelo sistema ósseo através da locomoção e suporte físico dos animais implantados. Nesse estudo, nenhuma das blendas apresentam fendas e invasão celular em seu interior até o período de 180 dias, o que revela que o material se mantém íntegro até esse período.

A regeneração tecidual é influenciada por fatores como tipo ósseo (cortical ou medular), local de implantação dos pinos, severidade do trauma causado, grau de fixação durante a recuperação tecidual, além da espécie e idade do animal. Os modelos experimentais eleitos para esse trabalho eram ratos da linhagem Wistar adultos jovens, com pouco crescimento residual remanescente. Ainda assim a migração de células osteo-progenitoras frente à interface osso-implante foi marcante, advinda principalmente da medula e cortical interna, assim como relatado por DAVIES (2000).

Mesmo no grupo de 120 dias ainda foi observada a presença de osteóides, assim como a formação de osso medular em desenvolvimento que garantiram a vascularização durante o período experimental. Essa infra-estrutura de capilares atua ainda como via de drenagem para os produtos de degradação provenientes do metabolismo anaeróbico na área em regeneração, assim como favorece a migração de células mesenquimais a partir da medula e cortical interna que regulam diretamente a regeneração óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

Apesar de inúmeros estudos ilustrarem a ocorrência de efeitos colaterais oriundos da biodegradação, entre eles a formação de granulomas, reações alérgicas e de corpo estranho, assim como a presença de cápsula fibrosa envolvendo o material implantado (HASEGAWA, 2002; BERGSMA, 1993) nesse experimento os cortes histológicos revelaram ausência de células inflamatórias e reações de corpo estranho na interface óssea em períodos mais longos de implantes. Foi predominante a presença de células osteo-progenitoras povoando a interface e entremeadas por tecido mineralizado

Capítulo 6.

CONCLUSÕES FINAIS

O estudo das blendas de poli(L-co-D,L, ácido láctico)/poli(ε-caprolactona) PLLA/PCL in vitro mostraram macroscopicamente, em todas as composições um comportamento muito semelhante até o período de 180 dias, porém, no período de 220 dias, os materiais 100/0, 90/10 e 80/20 mostraram-se completamente degradados e de difícil manuseio. A blenda 70/30 foi a única a manter-se íntegra até o período de 220 dias, possivelmente por conter a maior quantidade de PCL em sua composição, o que a conferiu uma característica mais elástica. O mesmo fato pôde ser observado nas propriedades mecânicas desses materiais. Conforme a maior quantidade de PCL na blenda menor era o módulo de Young, porém até o período de 180 dias todas as amostras não mostraram sinais significativos de perda de suas propriedades mecânicas, o que é muito bom do ponto de vista biológico, visto que quanto mais lenta for a degradação de pinos em ossos longos, melhor a regeneração óssea, o que necessita de materiais com boas propriedades mecânicas, estimulando assim, a regeneração óssea.

As análises de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) todos os materiais mantiveram suas características íntegras até o período de 120 dias. Após 180 dias a blenda 70/30 foi a única que mostrou um processo de degradação nas imagens de superfície da fratura, o que não ocorreu com os demais materiais.

A perda de massa molar através do tempo de degradação em tampão fosfato ocorreu uniformemente em todas as blendas. Apesar da pouca quantidade de PCL da blenda 70/30 (PLDLA/PCL), os valores de M_w mostram que a presença de PCL deixa as amostras mais

estáveis à degradação em tampão fosfato até o período de 60 dias. Após esse período todos os materiais reagem de maneira similar a perda da massa molar, com quedas significativas de M_w até o período de 180 dias. Não foi possível verificar a perda de massa molar no período de 220 dias pois as amostras apresentavam se completamente degradadas.

As análises de DSC apresentam dados referentes aos valores de T_g para as blendas e verificou que até 120 dias de degradação, as amostras, apesar de se apresentarem opacas e esbranquiçadas não mostram sinais de degradação. Verificou-se também um pico de cristalização no resfriamento durante o processo das análises, confirmando a cristalinidade da PCL.

Nos estudos *in vivo*, as blendas PLDLA/PCL na composição 100/0 e 70/30, mostraram que em todos os grupos e materiais estudados ocorreu um processo de regeneração óssea crescente com o transcorrer dos períodos avaliados. O padrão de regeneração tecidual indicou o recrutamento e migração de células imaturas provenientes da medula e cortical interna, em mecanismo conhecido como osteocondução, culminando com a formação de osso maduro. O grau de organização tecidual se estabeleceu conforme o aumento no período de dias avaliado, não apresentando qualquer irregularidade no processo de regeneração tecidual. Tanto a blenda quanto o material puro demonstraram ser bem aceitos *in vivo*, porém com os resultados obtidos *in vitro*, podemos concluir que a blenda 70/30 seria a ideal para utilização na área ortopédica.

Capítulo 7

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aoyagi, Y., Yamashita, k., Doi, Y. Thermal degradation of poly(r-3-hydroxybutyrate), poly(e-caprolactone) and poly(s-lactide). *Polymer*.v. 76 . pp. 52-59 , 2002.
- Amato, I., Ciapetti, G., Pagani, S., Marletta, G., Satriano, C., Baldini, N., Granchi, D. Expression of cell adhesion receptors in human osteoblast cultured on biofunctionalized poly(caprolactone) surfaces. *Biomaterials*. v. 28 (25), pp.3668-78, 2007.
- Barbanti, S. H. Polímeros bioreabsorvíveis como suportes na engenharia de tecidos. *Polímeros: ciência e tecnologia*, v. 15. pp.13-21, 2005.
- Bergsma, J. E., De Bruijn, W. C., Rozema, F. R., Bos, R. R. Boering, G. Late degradation tissue response to poly(l-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials*, v.16, n.1, p.25-31. 1995.
- Bergsma, E. J., Rozema, F. R., Bos, R. R. Bruijn, W. C. Foreign body reactions to resorbable poly(l-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. *j oral maxillofac surg*, v.51, n.6,p.666-70. 1993.
- Blümm, E., Owen, A. J. Miscibility, crystallization and melting of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(l-lactide) blends. *Polymer*, v. 36 (21), pp. 4077-4081, 1995.

- Bos, R. R., Rozema, F. R., Boering, G., Nijenhuis, A. J., Pennings, A. J. Jansen, H. W. Bone-plates and screws of bioabsorbable poly (l-lactide)--an animal pilot study. *Br j oral maxillofac surg*, v.27, n.6,p.467-76, 1989.
- Bostman, O. M. Osteolytic Changes Accompanying Degradation Of Absorbable Fracture Fixation Implants. *J Bone Joint Surg Br*, V.73, N.4,P.679-82 (1991).
- Bouwman, J. P. Tuinzing, D. B. Biodegradable Osteosynthesis In Mandibular Advancement: A Pilot Study. *Br J Oral Maxillofac Surg*, V.37, N.1, P.6-10 (1999).
- Burg, K, L.; Porter, S.; Kellan, J, F. Biomaterial Developments For Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*. V. 21(23) P. 2347-59 (2000).
- Carothers, W. H.; Dorough, G. L.; Natta, F. J. V. Studies Of Polymerization And Ring Formation X The Reversible Polymerization Of Six-Membered Cyclic Esters. *J. Am. Chem. Soc.* V. 54, P. 761. (1932).
- Coraça, D.C. *Osteointegração De Implantes De Poli(L-Ácido Lático) Plla E Da Blenda De Poli(L-Ácido Lático)Plla/Poli(Óxido De Etileno)Peo Na Tíbia De Ratos*. Campinas: Unicamp. Dissertação (Mestrado Em Biologia Celular E Estrutural) – Universidade Estadual De Campinas, Instituto De Biologia, Departamento De Histologia. (2002).
- Dimitrios, N., B., Stergiou, A. Miscibility And Enzymatic Degradation Studies Of Poly(Caprolactone)/Poly(Propylene Succinate) Blends. *European Polymer Journal*, 43. 6, pp. 2491-03, 2007.
- Duarte, M. A. T.; Huguen, R. G.; Martins, E. S.; Pezzin, A. P. T.; Pezzin, S. H. Thermal And Mechanical Behavior Of Injection Molded Poly(3-Hydroxybutyrate)/Poly(ϵ -Caprolactone) Blends. *Materials Research*. V.9, pp. 26-27 ,2006.
- Costanzo, L. S. *Fisiologia*. 1ª Ed. Rio De Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, Cap. 7, Fisiologia Ácido-Básica, Pp. 243-264, 1998.

- Cutright, D. E., Hunsuck, E. E. Beasley, J. D. Fracture Reduction Using A Biodegradable Material, Polylactic Acid. *J Oral Surg*, V.29, N.6,P.393-7 (1972).
- Cutright De, Perez B, Beasley Jd, Larson Wj, Posey W. Degradation Rates Of Polymers And Copolymers Of Polylactic And Polyglycolic Acids. *J Oral Surg*. 37: 143-152 1974.
- Davies Je, Hosseini M. Histodynamics Of Endosseous Wound Healing. In: Davies Je, Editor. *Bone Engineering*. Toronto: Squared Inc. P. 1-14 ,2000.
- Davies, J. Mechanisms Of Endosseous Integration. *Int J. Prosthodont* v. 11, pp. 426-445, 1998.
- Duek, E. A. R.; Zavaglia, C. A. C.; Belangero, W. D. In Vitro Study Of Poly(Lactid Acid) Pin Degradation. *Polymer*. v.40, pp. 6465-6473 , 1999.
- Edwards, R. C., Kiely, K. D. Eppley, B. L. Fixation Of Bimaxillary Osteotomies With Resorbable *J Oral Maxillofac Surg*. Plates And Screws: Experience In 20 Consecutive Cases., V.59, N.3, Mar, P.271-6. 2001.
- Fang, Z.; Starly, B.; Sun, W.; Computer-Aided Characterization For Effective Mechanical Properties Of Porous Tissue Scaffolds. *Computer-Aided Desegn*, . 37, Pp.65-72 .2005.
- Ferreira, B. M. P.; Zavaglia, C. A. C.; Duek, E. A. R. Films Of Plla/Phbv: Thermal, Morphological, And Mechanical Characterization. *Journal Of Applied Polymer Science*. v. 86, pp.2898-2906 , 2002.
- Gogolewski S.; Jovanovic, M. Dilton G.; Hughes, K. The Effect Of Melt-Processing On The Degradation Of Selected Polyhydroxyacids: Polylactides, Polyhydroxybutyrate, And Polyhydroxybutyrate-Co-Valerates. *Polymer Degradation And Stability*, V.40, Pp.313-322 , 2000.

- Hasegawa Y, Sakano S, Toshiki I, Warashima H. The Long-Term Behavior Of Poly-L-Lactide Screws In A Minipig Fracture Model: Preliminary Report. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)*. 63: 679-685.2002.
- Higuchi, K.W. *Orthodontic Application Of Osseointegrated Implants*. Carol Stream. Quintessence Inc, 1^a Ed, 2000.
- Hollinger, J. O. Battistone, G. C. Biodegradable Bone Repair Materials. Synthetic Polymers And Ceramics. *Clin Orthop Relat Res*, 207, P..290-305. 1986.
- Heidemann, W., Jeschkeit, S., Ruffieux, K., Fischer, J. H., Wagner, M., Kruger, G., *Et Al*. Degradation Of Poly(D,L)Lactide Implants With Or Without Addition Of Calciumphosphates In Vivo. *Biomaterials*, .22, .17, pp.2371-81. 2001.
- Heinch, L, . Bioceramics. *Journal Of The American Ceramic Society*, V.81,N.7, P. 1705-28. 1998.
- Holland, S, J.; Yasin, M. Polymers For Biodegradable Medical Devices. 1. The Potencial Of Polyesters As Controlled Macromolecular Release Systems. *J. Controlled Rel.* V. 4, P. 155-80, 1986..
- Huang, W., Carlsen, B., Wulur, I., Rudkin, G., Ishida, K., Wu, B., Yamaguchi, D. T., Miller, T. A. Bmp-2 Exerts Differential Effects On Differentiation Of Rabbit Bone Marrow Stromal Cells Grown In Two-Dimensional And Three-Dimensional Systems And Is Required For In Vitro Bone Formation In A Plga Scaffold. *Experimental Cell Research*, V.299, Pp. 325-334, 2004.
- Jeon, O., Song, S, J., Kim, B, S. Enhancement Of Ectopic Bone Formation By Bone Morphogenetic Protein-2 Released From A Heparin-Conjugated Poly(L-Lactide-Co-Glycolic Acid) Ascaffold. *Biomaterials*. 28, 17, pp. 2763-71. 2007.

- Junqueira, L.C., Carneiro, J.C. *Histologia Básica*. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 8^a Ed, 1995.
- Joshua, S., C., Bostron, M. Synthetic Bone Scaffolds And Fracture Repair. *Injury*. 38, 1 pp.33-97. 2007.
- Kellomäki, M., Tormala, P. Processing Of Resorbable Poly-Alpha-Hydroxy Acids For Use As Tissue-Engineering Scaffolds. *Methods In Molecular Biology*, V.238, pp. 1-10, 2004.
- Kusuzaki, K., Kageyama, N., Shinjo, H., Takeshita, H., Murata, H., Hashiguchi, S., Et Al. Development Of Bone Canaliculi During Bone Repair. *Bone* v. 27, pp. 655-659 2000.
- Kissel. J. Parenteral Depot-Systems On The Basis Of Biodegradable Polyesters. *J. Controlled Rel.* v. 16, n. 27, 1991.
- Kopecek, J.; Ulbrich, K. Biodegradation On Biomedical Polymers. *Prog. Polym. Sci.* v. 9, pp. 1-58, 1983.
- Lakes, R. *The Biomedical Engineering Handbook*, 2^a Ed., Crc Press, 1999, Cap. 40, *Composite Biomaterials*, pp. 40.
- Laine, P., Kontio, R., Lindqvist, C. Suuronen, R. Are There Any Complications With Bioabsorbable Fixation Devices? A 10 Year Review In Orthognathic Surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v.33, n.3.pp.240-4. 2004.
- Langer, R., Tirrell, D. A. Designing Materials For Biology And Medicine. *Nature*, V.428, pp. 487-492, 2004.
- Leenslag, J. W.; Pennings, A. J.; Bos, R. R. M.; Rozema, F. R.; Boering, G. Resorbable Materials Of Poly(L-Lactide). Viii In Vivo E In Vitro Degradation. *Biomaterials*. V.8, P. 311-314, 1987.

- Lemmouchi, Y., Schacht, E., Kageruka, P., De Deken, R., Diarra, B., Dially, O., Geerts, S. Biodegradable Polyesters For Controlled Release Of Trypanocidal Drugs: *In Vitro* And *In Vivo* Studies, *Biomaterials* 19, pp.1827-1837, 1998.
- Lewis, D. H. Controlled Release Of Bioactive Agents From Lactide/Glycolide Polymers In *Biodegradable Polymers As Drug Delivery Systems* (M. Chasis And R.Langer, Eds.), Marcel Decker, New York, Chapter 1, 1990.
- Li, S.; Vert, M.; Biodegradation Of Aliphatic Polyesters, In *Degradable Polymers: Principles E Applications* (Eds.G. Scott E D. Gilead), Chapman & Hall, London, pp.42-87, 1995
- Li, W-J., Tuli, R., Okafor, C., Derfoul, A. Danielson, K. G., Hall, D. J., Tuan, R. S. A Three-Dimensional Nanofibrous Scaffold For Cartilage Tissue Engineering Using Human Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterials*, V. 26, P. 599–609, 2005.
- Lima, F.M. Regeneração Tecidual Guiada Entre Duas Superfícies Ósseas Aproximadas Por Distração Osteogênica – In Vivo. *Tese: Mestrado Em Odontologia (Ortodontia) – Universidade Do Brasil –Ufrj, Faculdade De Odontologia*, P. 65. 2004.
- Lindhardt, R. *Polymers For Controlled Release Of Drugs*, Springer-Verlag. New York, Chapter2 , 1988.
- Luciano, R. M., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R., Alberto–Rincon, M. C. Synthesis And Characterization Of Poly(L-Lactic Acid) Membranes: Studies In Vivo And In Vitro. *Journal Of Materials Science: Materials In Medicine*, v.14, pp. 87-94, 2003.
- Lucchesi, C.; Ferreria, B. M. P. Duek, E. A. R.; Joazeiro, P. P. Surface Modification Of Phbv Affects Inicial Cell Attachment, Cell Morfology And Cell Growth. *Anais Do Xx Congresso Da Sociedade Brasileira De Microscopia E Microanálises*. Águas De Lindóia, Sp. Brasil, 2005.
- Mainil-Varlet, P., Rahn, B., Gogolewski, S. Long-Term *In Vivo* Degradation And

- Bone Reaction To Various Polylactides. *Biomaterials*, 18, 3, 257-266. 1997.
- Mano, E. B. Mendes, L.C. *Introdução A Polímeros*; 2ª Ed. Editora Edgar Blucher Ltda. São Paulo, 1999.
- Merolli, A., Gabbi, C., Cacchioli, A., Ragionieri, L., Caruso, L., Giannotta, L., *Et Al.* Bone Response To Polymers Based On Poly-Lactic Acid And Having Different Degradation Times. *J Mater Sci Mater Med*, V.12, N.9, , P.775-8. 200.
- Middleton, J. C.; Tipton, A. J. Synthetic Biodegradable Polymers As Orthopedic Devices. *Biomaterials*, V.21, P. 2335-2346 2000.
- Motta, A, C. Duek, E. A.. R. Sínteses, Caracterização E Degradação “In Vitro” Do Poli(L-Acido Lático). *Polimeros: Ciência E Tecnologia*. v. 16, pp.26-32, 2006.
- Niinomi. M. Fatigue Characteristics Of Mettalic Biomaterials. *International Journal Of Fatigue*, 29, 6. pp 992-000, 2007.
- Nojima, L.I. Novo Sistema De Implantes Subperiosteal E Intra-Ósseo Como Ancoragem Ortodôntica. Estudo Experimental Em Coelhos. *Tese: Doutorado Em Odontologia (Ortodontia) – Universidade Do Brasil –Ufrj, Faculdade De Odontologia*, p. 77. 2004.
- Norholt Se, Pedersen Tk, Jensen J. Le Fort I. Miniplate Osteosynthesis: A Randomized, Prospective Study Comparing Resorbable Plla/Pga With Titanium. *Int J Oral Maxillofac Surg* . p. 245-252..2004
- Park,T.G.,Cohen,S.,Langer,R. Poly(L-Lactic Acid)Pluronic Blends: Characterization Of Phase Separation Behavior, Degradation, And Morphology And Use As Protein-Releasing Matrices. *Macromolecules*, 25,116-122.1992.
- Paul, D.R.; Newman, S.; *Polymer Blends*, Orlando: Academic Press, Inc., 1978.

- Paul, D.R.; Barlow, J. W.; Keskkila, H. Polymer Blends In Encyclopedia Of Polymer Science And Engennering, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, V.12, P.399-461, 1989.
- Peltoniemi, H., Ashammakhi, N., Kontio, R., Waris, T., Salo, A., Lindqvist, C., *Et Al.* The Use Of Bioabsorbable Osteofixation Devices In Craniomaxillofacial Surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, V.94, N.1,P.5-14. 2002.
- Pezzin, A.P.T., Alberta Van Ekenstein, G.O.R., Duek, E.A.R., Mel Behavior, Crystallinity And Morphology Of Poly(P-Dioxanone) (Ppd). *Polymer*, V. 42, Pp. 8303-8306, 2001
- Pietrzak, W. S.; Sarver, D. R.; Verstynen, M. L. Bioabsorbable Polymer Science For The Practicing Surgeon. *Journal Of Craniofacial Surgery*, v. 2, pp. 87-91 (1997).
- Pinto, M. R.; Alberto-Rincon, M, C.; Lucchesi, C. Duek, E. A. R. In *Vivo Interection Of Poly(L-Lactide-Co-D,L-Lactide)/ Poly(Ethilene Oxide) Blends Containing Plasticizer*. *Anais Do Xx Congresso Da Sociedade Brasileira De Microscopia E Microanálises*. Águas De Lindóia, Brasil. 2005.
- Pinto, M, R.; Alberto-Rincon. M, C.; Duek. E. A. R. Estudo In Vivo De Belndas De Poli(Ácido Lático)/ Poli(Hidroxibutirato-Co-Hidroxivalerato) Após Implante Subcutâneo. *Anais Do Iii Congresso Latino Americano De Biomateriais E Órgãos Artificiais*. Campinas- Sp. Brasil, 2004.
- Pitt, C. G.; Schindler, A. *The Design Of Controlled Drug Delivery Systems Based On Biodegradable Polymers*. In: E.S.E. Hafez (Ed)., Progress In Contraceptive Delivery Systems, M.T.P. Publishers, Lancaster, p.17-46 , 1980.
- Pitt, C. G.; Schindler, A. *Biodegradation Of Polymers In Controlled Drug Delivery*, (S.D. Bruck, Ed), Crc Press, Boca Raton, V. 1, Pp. 53-80 1983.
- Reading, M.; Luget, A.; Wilson, R. *Thermochim. Acta*, v.238, P. 295 1994.

- Rezwan, K.; Chen, Q. Z.; Blaker, J. J.; Boccaccini, A. R. Biodegradable And Bioactive Porus Polymer/Inorganic Composite Scaffold For Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*, v. 27, pp.3413-3431. 2006.
- Rieger, C, L. *Propriedades Mecânicas Do Osso*. In: Gould Iii, J A, *Fisioterapia Na Ortopedia E Na Medicina Do Esporte*. Cap1, P.3-47 São Paulo 1993.
- Saha, K. S.; Tsuji, H. Effects Of Molecular Weight And Small Amount Of D-Lactide Units On Hydrolyc Degradation Of Poly(L-Lactide Acid)S.Pomymmer. *Degradation And Stability*.V. 91, Pp.1665-1673, 2006.
- Sakata, M. M.; Alberto-Rincon, M. C.; Duek, E, A, R. Estudo Da Interação Polímero/Cartilagem/Osso Utilizando Plga/Pds Em Condilo Femural De Coelhos. *Polimeros*. _V._24, Pp. 176-180, 2004.
- Santavirta, S., Konttinen, Y. T., Saito, T., Gronblad, M., Partio, E., Kemppinen, P., *Et Al*. Immune Response To Polyglycolic Acid Implants. *J Bone Joint Surg Br*, V.72, N.4, Jul, P.597-600. 1990.
- Shand, J. M. Heggie, A. A. Use Of A Resorbable Fixation System In Orthognathic Surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg*, V.38, N.4, P.335-7. 2001.
- Shin, H. Ishii, S. Tamura, J. Furukawa, T. Neo, M. Matsusue, Y. Shikinami. Okuno, M. Nakamura, T. A 5–7 Year In Vivo Study Of High-Strength Hydroxyapatite/Poly(L-Lactide) Composite Rods For The Internal Fixation Of Bone Fractures .*Biomaterials*, V. 27-8 P. 1327-1332. 2006
- Suganuma, J., Alexander H. Biological Response Of Intramedullary Bone To Poly (L-Lactic Acid). *J Appl Biomater*: P. 413-27. 1993.

- Sung, H-J.; Meredith, C.; Johnson, C.; Galis, Z. S. The Use Of Temperature-Composition Combinatorial Libraries To Study The Effects Of Biodegradable Polymer Blends Surfaces On Vascular Cells. *Biomaterials*. V. 26, P. 4557-4567, 2005.
- Suuronen, R., Pohjonen, T., Hietanen, J. Lindqvist, C. A 5-Year In Vitro And In Vivo Study Of The Biodegradation Of Polylactide Plates. *J Oral Maxillofac Surg*, V.56, N.5p.604-14, 1998.
- Texas Health Science Center, The University Of. *Software Image Toll*. San Antonio, Texas, Eua. Disponível Em : [Http://Ddsdx.Uthscsa.Edu/Dig/Download.Html](http://Ddsdx.Uthscsa.Edu/Dig/Download.Html). 2005.
- Ten Cate, A. *Oral Histology – Development, Structure And Function*. St Louis, 4th Ed., Mosby Inc, 1994.
- Todo, M., Park, S., Takayama, T., Arakawa, K. Fracture Micromechanisms Of Bioabsorbable Plla/Pcl Polymer Blend. *Engineering Fracture Mechanics*, 74. 12 2007.
- Tschakaloff, A., Losken, H. W., Von Oepen, R., Michaeli, W., Moritz, O., Mooney, M. P., *Et Al*. Degradation Kinetics Of Biodegradable Dl-Polylactic Acid Biodegradable Implants Depending On The Site Of Implantation. *Int J Oral Maxillofac Surg*, V.23, N.6 Pt 2, P.443-5, 1994.
- Tsuji, H. In: Doi Y, Steinbu" Chel A, Editors. Polyesters 3. Biopolymers, Vol. 4. Weinheim (Germany): Wiley-Vch; Chapter 5, . pp. 129–77 , 2002.
- Turvey, T. A., Bell, R. B., Tejera, T. J. Proffit, W. R. The Use Of Self-Reinforced Biodegradable Bone Plates And Screws In Orthognathic Surgery. *J Oral Maxillofac Surg*, V.60, N.1,P.59-65. 2002.
- Van Der Elst, M., Bramer, J. A., Klein, C. P., De Lange, E. S., Patka, P. Haarman, H. J. Biodegradable Interlocking Nails For Fracture Fixation. *Clin Orthop Relat Res*, N.357, Dec, P.192-204. 1998.

- Vert, M.; Li, S. M.; Spenlehauer, G.; Guerin, P. Bioresorbability And Biocompatibility Of Aliphatic Polyesters. *J. Mat. Sci. Mater. Med*, V. 3, Pp. 432-446, 1991.
- Vert, M., Li, M. S., Spenlehauer, G., Guerin, P. Bioresorbability And Biocompatibility Of Aliphatic Polyesters. *Journal Of Materials Science*, V.3, Pp. 432-436, 1992.
- Willians, D.F. (Ed), Definitions In Biomaterials - Progress In Biomedical Engineering, *Elsevier*, V.4, Cap.1, 1987.
- Woodward, S. C., Brewer, P. S., Moatamed, F., Schindler, A., Pitt, C. G. Intracellular Degradation Of Poli(Epsilon-Caprolactone). *Journal Of Biomedical Materials Research*, V.19, Pp. 437-444, 1985.
- Zang, X., Hua, H. Shen, X. Yang, Q. In Vitro Degradation And Biocompatibility Of Poly(L-Lactide Acid) Chitosan Fiber Composites. *Polymer*, 48. 9, pp. 1005-11. 2007.